Instituto Tecnológico Superior de Abasolo
Organismo Público Descentralizado del Gobierno del Estado de Guanajuato.

CONTROL ORGÁNICO DE *Neopestalotiopsis* spp. EN EL CULTIVO DE FRESA (*Fragaria* x *ananassa* Duch)

Tesis profesional para obtener el título de:

Ingeniero en Innovación Agrícola Sustentable

Presentan:

Jorge Delgado Vargas
Johana Jacqueline Zavala Witrago

Director de Tesis:

M.C. Anabel Flores Lee

Codirector de Tesis:

Dr. Luis Patricio Guevara Acevedo

ABASOLO, GTO. 17/11/2023

Autorización de presentación de trabajo de titulación

Se autoriza a los estudiantes **Jorge Delgado Vargas** y **Johana Jacqueline Zavala Witrago** inscritos en la Ingeniería “Innovación Agrícola Sustentable” del Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, con los números de control **AS19110053** y **AS19110028**, a defender su proyecto de trabajo de titulación **“Control orgánico de *Neopestalotiopsis* spp. en el cultivo de fresa (*Fragaria* x *ananassa* Duch)”** ante el comité sinodal asignado.

La presente se expide en Abasolo, Guanajuato a 17 de noviembre de 2023.

_____
M.C. Anabel Flores Lee
Presidente del sínodo

_____
Dr. Luis Patricio Guevara Acevedo
Secretario del sínodo

_____
Dr. Oscar Jesús Ortiz Arrazola
Vocal del sínodo

Dedicatorias

Jorge Delgado Vargas

Dedico todo este esfuerzo a mi abuelito **Ernesto**, quien fue un pilar importante en mi crecimiento y sigue presente en mi vida, gracias a él soy quien soy, sé que desde el cielo estás muy orgulloso de todo lo que he logrado.

A mis padres, **Juan y Elena**, por estar presentes en todo momento y brindarme las herramientas para consumar cada uno de mis logros.

A mis abuelos, **Francisco y Teresa**, por motivarme cada día durante este largo trayecto a luchar por mis sueños y no darme por vencido nunca, también por ser un ejemplo a seguir durante todo mi crecimiento y formación.

Johana Jacqueline Zavala Witrago

A ti **Dios** “el señor de los ejércitos” por acompañarme en cada etapa de mi vida, por los momentos más hermosos que me has regalado y por aquellos difíciles en los que nunca me has abandonado. Gracias por la sabiduría y paciencia que has puesto en mí.

A mis padres **Sergio y Rocío**, por su apoyo incondicional y motivarme cada día a alcanzar mis sueños, por ser un ejemplo en vida y por el amor que siempre me han demostrado. Agradezco que hayan creído en mí brindándome la libertad y la confianza que necesitaba para desarrollarme y cumplir una de mis metas.

A mí Tía **María**, por ser una segunda madre para mí, por sus palabras de aliento, apoyo y confianza que me ha brindado a lo largo de mi vida.

A mi hermana **Yareli** y mi hermano **Sergio**, por representar en mi vida el estímulo y la motivación que me inspiraba a seguir adelante.

A mis amigos: **Jorge, Samuel y Cristian** por todos los momentos inolvidables que hemos compartido. Gracias por ayudarme y orientarme en mi vida respetando y aceptando mi forma de ser, por nuestra amistad.

En especial a **Jorge** por el gran apoyo que me demostró en los últimos momentos de este trabajo, pero sobre todo por ser como es, por haberme dejado conocerlo y por todos esos momentos compartidos.

“Si alguno de ustedes les falta sabiduría, pídasela a Dios, y él se la dará, pues Dios da a todos generosamente sin menospreciar a nadie”. Santiago 1:5.

Agradecimientos

Jorge Delgado Vargas

Primeramente, agradezco infinitamente a Dios, porque siempre me mantuvo en el camino y me puso en pie durante este largo camino, confío ciegamente en qué nunca me dejará solo, y me ayudará a cumplir todos mis sueños, pongo en sus manos mi destino y mi profesionalismo.

Agradezco mucho a mi compañera Johana, quien me ha apoyado en todo momento y gracias a ella se logró el proyecto, por su gran entusiasmo y buena vibra que me motivó a dar siempre lo mejor de mí, siempre estaré en deuda con ella y con su gran espíritu, agradezco mucho a Dios por ponerla en mi camino.

Agradezco mucho a mis mejores amigos, quienes hicieron está carga más liviana y estuvieron en los momentos más importantes, a Cristian, a Samuel, a Johana y a Perlita, siempre me mostraron lo real de una buena amistad, y lo grandioso de su gran personalidad, y porque ya se volvieron parte de mi familia.

Agradezco a nuestra asesora, la maestra Anabel, quien nos apoyó incondicionalmente a sacar adelante este proyecto, y siempre mostró empatía hacía nosotros, además porque fue un pilar importante en el desarrollo de esta investigación, y por ser una gran persona. Del mismo modo, a la Dra. Virginia, quien siempre nos motivó para seguir adelante y no rendirnos.

Del mismo modo al ITESA, por brindarme los recursos necesarios para la realización de este proyecto, al Dr. Oscar por la atención brindada y las correcciones realizadas, y también al Dr. Patricio por la atención brindada en la mejora de este documento.

Johana Jacqueline Zavala Witrago

Al **Instituto Tecnológico Superior de Abasolo**, por la oportunidad de realizar mi carrera profesional en sus instalaciones y brindarme los recursos necesarios para concluir este trabajo.

A la **M.C. Anabel Flores Lee**, por su tiempo, paciencia, sugerencias y dedicación para la realización del trabajo de investigación. Así mismo, por sus palabras de apoyo y motivación de salir adelante para alcanzar las metas propuestas. Por las revisiones y correcciones realizadas al presente escrito.

Al **Dr. Luis Patricio Guevara Acevedo** por las correcciones realizadas para mejorar este escrito.

Al **Dr. Oscar Jesús Ortiz Arrazola** por las correcciones realizadas para mejorar este escrito.

A la **Dra. Virginia Ortiz Timoteo**, por el apoyo y atención brindada al compartir sus conocimientos, por sus valiosas aportaciones para mejorar las correcciones realizadas a este escrito.

Resumen

El presente proyecto de investigación tuvo por objetivo evaluar la efectividad biológica de tres productos orgánicos (ácido algínico, extracto de sauce blanco e inoculante biológico a base de *Trichoderma harzianum, Trichoderma viride, Bacillus subtilis y Bacillus megaterium*) y un producto químico (Cyprodinil + Fludioxinil) para el control de *Neopestalotiopsis* spp. El proyecto se realizó en el Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, en el área experimental del invernadero. Para la evaluación se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con tres bloques y un total de 72 plantas de fresa en cepellón de la variedad San Andreas. En todos los tratamientos se evaluaron tres variables: 1) patogenicidad y virulencia, 2) mortalidad y 3) severidad. Únicamente en las pruebas de confrontación dual se evaluó la eficiencia de *Trichoderma* spp. en la supresión de *Neopestalotiopsis* spp. Los datos se registraron a diario y posteriormente se analizaron en el programa Statgraphics® (Centurion XVI, versión 2009) y en Excel. Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento 3 (inoculante biológico) presentó los mejores resultados con grado 1 de severidad a los 10, 20 y 30 días, observándose amarillamiento en el follaje de las plantas tratadas, pero sin registrarse mortalidad (0%). Sustentado a lo anterior, en las pruebas de confrontación dual entre *Neopestalotiopsis* spp. y *Trichoderma* spp. se obtuvo un porcentaje de inhibición del 80% a las 148 horas, confirmando el efecto de *Trichoderma* spp. contra el hongo fitopatógeno. Otros tratamientos que pueden ser una alternativa para el control de *Neopestalotiopsis* spp. de acuerdo con el porcentaje de mortalidad y grado de severidad son tratamiento 3 (inoculante biológico) con 25% y tratamiento 4 (Cyprodinil + Fludioxonil) con 25%.

Palabras Clave: fitopatógeno, severidad, inhibición y mortalidad.

Abstract

The research project objective was to evaluate three organic products and a chemical product biological effectiveness (alginic acid, white willow extract and biological inoculant based on *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium*) (Cyprodinil + Fludioxinil) for *Neopestalotiopsis* spp. control. The Project was performed in the Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, at the greenhouse experimental area. A completely randomized block design (CRBD) with three blocks and a 72 San Andreas strawberry plantlets total were used for evaluation. Three variables were evaluated in all treatments: 1) pathogenicity and virulence, 2) mortality and 3) severity. Only in the dual confrontation tests was evaluated the *Trichoderma* spp. efficiency in *Neopestalotiopsis* spp. suppression. The data were recorded daily and subsequently analyzed in the Statgraphics® program (Centurion XVI, version 2009) and in Excel. The results obtained showed that treatment 3 (biological inoculant) presented the best results with severity degree 1 at 10, 20 and 30 days, observing yellowing in the foliage of the treated plants, but without registering mortality (0%). Based on the above, in the dual confrontation tests between *Neopestalotiopsis* spp. and *Trichoderma* spp. an 80 inhibition percentage was obtained at 148 hours, confirming the *Trichoderma* spp. effect against the phytopathogenic fungus. Other treatments that can be an alternative for the *Neopestalotiopsis* spp. control according to the mortality percentage and severity degree are treatment 3 (biological inoculant) with 25% and treatment 4 (Cyprodinil + Fludioxonil) with 25%.

Key words: phytopathogen, severity, inhibition and mortality.

Índice de contenido

Dedicatorias iii

Agradecimientos v

Resumen vii

Abstract viii

INTRODUCCIÓN 1

I. GENERALIDADES DEL PROYECTO 2

1.1 Planteamiento del problema 3

1.2 Justificación 3

1.3 Hipótesis 4

1.4 Objetivos 4

1.4.1 Objetivo general 4

1.4.2 Objetivos específicos 4

II. MARCO TEÓRICO 5

2.1 Cultivo de fresa 6

2.1.1 Importancia del cultivo 6

2.1.2 Taxonomía del cultivo 7

2.2 Descripción botánica 7

2.2.1 Corona 8

2.2.2 Hojas 8

2.2.3 Flores 9

2.2.4 Fruto 9

2.3 Requerimientos edafoclimáticos 9

2.3.1 Requerimientos edáficos....9
2.3.2 Requerimientos climáticos....10
2.3.3 Requerimientos hídricos....10
2.3.4 Requerimientos nutricionales....11
2.4 Enfermedades en el cultivo de fresa....12
2.4.1 Mancha angular por *Xanthomonas fragariae*....12
2.4.2 Marchitamiento por *Fusarium* spp.....13
2.4.3 Marchitamiento por *Verticillium dahliae*....14
2.4.4 Podredumbre de corona por *Rhizoctonia* spp.....15
2.4.5 Podredumbre de corona y fruto por *Phytophthora capsici*....16
2.4.6 Podredumbre de frutos por antracnosis....17
2.4.7 Podredumbre de frutos por *Botrytis cinerea*....18
2.4.8 Podredumbre de raíces por *Phytium* spp.....20
2.5 *Neopestalotiopsis* spp....20
2.5.1 Taxonomía de *Neopestalotiopsis* spp.....23
2.6 Control....23
2.6.1 Control cultural....23
2.6.2 Control químico....24
2.6.3 Control biorracional....24
2.6.4 Control biológico....25
2.7 Suelos supresivos y conductivos....25
2.8 Investigaciones relacionadas con *Neopestalotiopsis* spp.....26
III. METODOLOGÍA....30
3.1 Localización....31

3.2 Especie a evaluar 32
3.3 Establecimiento del área de trabajo.....32
3.4 Desinfección del suelo y materiales de trabajo.....33
3.5 Preparación del material vegetal 39
3.5.1 Trasplante 39
3.5.2 Distribución del material vegetal en el invernadero.....40
3.6 Manejo del cultivo 41
3.6.1 Riego.....41
3.6.2 Desarrollo del cultivo 41
3.6.3 Control de plagas 42
3.6.4 Fertilización 44
3.7 Selección de sitios de muestreo 46
3.8 Aislamiento e identificación del patógeno 47
3.8.1 Identificación morfológica.....55
3.9 Inoculación del patógeno en la planta 57
3.9.1 Incisión en el tallo.....57
3.10 Diseño experimental 58
3.11 Tratamientos.....59
3.11.1 Aplicación de los tratamientos.....60
3.11.2 Cálculos para la dosis de cada producto 62
3.12 Signos de *Neopestalotiopsis* spp. en el cultivo 65
3.13 Variables de respuesta 65
3.13.1 Patogenicidad y virulencia 65
3.13.2 Eficiencia de *Trichoderma* spp. en la supresión de *Neopestalotiopsis* spp. 67

3.13.3 Mortalidad de plantas 69
3.13.4 Severidad en plantas 69
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 50
4.1 Identificación morfológica de *Neopestalotiopsis* spp. 73
4.2 Patogenicidad y virulencia 76
4.3 Confrontación dual de *Trichoderma* spp. y *Neopestalotiopsis* spp. 78
4.4 Mortalidad de plantas 80
4.5 Severidad en plantas 81
4.5.1 Severidad a los 10 días de aplicados los productos 81
4.5.2 Severidad a los 20 días de aplicados los productos 83
4.5.3 Severidad a los 30 días de aplicados los productos 86
V. CONCLUSIÓN 89
VI. REFERENCIAS 91
VII. ANEXOS 102

Índice de tablas

Tabla 2.1 - Clasificación taxonómica de la fresa. 7

Tabla 2.2 - Fertilizantes para preparar mil litros de solución nutritiva. 11

Tabla 2.3 - Taxonomía de *Neopestalotiopsis* spp. 23

Tabla 3.1 - Muestras en corona y hoja. 51

Tabla 3.2 - Tratamientos. 60

Tabla 3.3 - Escala de severidad de *Neopestalotiopsis* spp. en fresa. 69

Tabla 4.1 - Prueba de significancia de Tukey con un 95% de confianza para el grado de severidad por tratamiento a los 10 días de aplicados los productos. 82

Tabla 4.2 - Prueba de significancia de Tukey con un 95% de confianza para el grado de severidad por tratamiento a los 20 días de aplicados los productos. 85

Tabla 4.3 - Prueba de significancia de Tukey con un 95% de confianza para el grado de severidad por tratamiento a los 30 días de aplicados los productos. 87

Tabla 7.1 - Análisis de la varianza ANOVA para el grado de severidad por tratamiento a los 10 días de aplicados los productos. 104

Tabla 7.2 - Análisis de la varianza ANOVA para el grado de severidad por tratamiento a los 20 días de aplicados los productos. 104

Tabla 7.3 - Análisis de la varianza ANOVA para el grado de severidad por tratamiento a los 30 días de aplicados los productos. 104

Tabla 7.4 - Cronograma de actividades a seguir durante el transcurso del proyecto. 105

Tabla 7.5 - Equipo, materiales e insumos requeridos en este proyecto. 106

Índice de figuras

Figura 2.1 - Morfología de la fresa 8

Figura 2.2 - Daño ocasionado por la salinidad del suelo en plantas de fresa. Planta sana a la derecha y plantas afectadas a la izquierda. 11

Figura 2.3 - Morfología de *Xanthomonas fragariae*: A) Células bacilares en una colonia y B) Células bacilares con hebras algodonosas 13

Figura 2.4 - Signos avanzados de mancha angular 13

Figura 2.5 - Crecimiento de las colonias: A) Microconidio, B) Clamidosporas y C) Hongo *Fusarium oxysporum* 14

Figura 2.6 - Daños por *Fusarium oxysporum* en frutos 14

Figura 2.7 - Conidióforos de *Verticillium dahliae*. 15

Figura 2.8 - Signos de *Verticillium dahliae*: A) Marchitez en hojas viejas, B) Planta con signos iniciales de marchitez y C) Comparación de tamaños entre plantas enfermas y sanas..... 15

Figura 2.9 - Características morfológicas de *R. solani*: 1) Constricción, 2) Septas y 3) Ramificación en ángulo recto 16

Figura 2.10 - Síntoma de podredumbre de corona ocasionada por *Rhizoctonia* spp. 16

Figura 2.11 - Oosporas de *Phytophthora capsici* 17

Figura 2.12 - Podredumbre de corona ocasionada por *Phytophthora* 17

Figura 2.13 - Signos de antracnosis*:* A) Daños en peciolo y B) Pudrición de frutos 18

Figura 2.14 - Podredumbre del fruto ocasionada por *Botrytis cinerea*: A) Daños en fruto y B) Micelio en fruto 19

Figura 2.15 - Observación de *Botrytis cinerea* en microscopio..... 19

Figura 2.16 - Podredumbre radicular por *Phytium* 20

Figura 2.17 - Signos de *Neopestalotiopsis* spp.: A) Daño en hojas y B) Daño en corona y raíces 22

Figura 2.18 - Crecimiento de *Neopestalotiopsis clavispora* en medio de cultivo PDA y su estructura 22

Figura 3.1 - Área de trabajo. 31

Figura 3.2 - Cepellones de fresa. 32

Figura 3.3 - Armado del invernadero. 32

Figura 3.4 - Colocación superficial del tezontle. 33

Figura 3.5 - Limpieza de la estructura: A) Jabón biodegradable que se utilizó y B) Eliminación de residuos. 34

Figura 3.6 - Esterilización de la estructura: A) Desinfectante agrícola utilizado, B) Máquina aspersora con 15 L de agua, C) Preparación del producto y D) Aplicación del producto. 35

Figura 3.7 - Desinfección de las macetas: A) Eliminación de contaminantes, B) Macetas esterilizadas y C) Maceta de 1.3 L que se utilizarán en el experimento. 36

Figura 3.8 - Fungicida - bactericida: A) Ingredientes activos e inertes, B) Ficha técnica y C) Producto utilizado. 37

Figura 3.9 - Suelo utilizado. 37

Figura 3.10 - Prueba del puño. 38

Figura 3.11 - Desinfección del suelo: A) Aplicación del producto y B) Suelo cubierto en plástico negro listo para el proceso de biosolarización. 39

Figura 3.12 - Trasplante: A) Producto fúngico con ingrediente activo Propomocarb + Fosetil, B) Inmersión pre-trasplante y C) Trasplante de cepellones de fresa. 40

Figura 3.13 - A) Cubierta plástica para evitar el establecimiento del patógeno, B) Diseño experimental en campo y C) Identificación de cada planta por tratamiento y repetición. 41

Figura 3.14 - Desarrollo de los cepellones de fresa en las macetas: A) 3 días después del trasplante (ddt), B) 4 ddt, C) 10 ddt, D) 13 ddt, E) 15 ddt, F) 21 ddt y G) 30 ddt.42

..... 44

Figura 3.15 - Productos aplicados: A) Insecticida botánico a base de aceite de semilla de soya, B) Sales potásicas de ácidos grasos + organosiliconas y C) Repelente a base de *Oleroresina capsicum.* 44

Figura 3.16 - A) Algas marinas y B) Enraizador. 45

Figura 3.17 - Regulador de crecimiento vegetal. 45

Figura 3.18 - Fertilizante orgánico. 46

Figura 3.19 - Sitios de muestreo: A) Macrotúnel y B) Condiciones de campo. 46

Figura 3.20 - Identificación de la muestra en campo. 47

Figura 3.21 - Eliminación de impurezas. 48

Figura 3.22 - Preraración del medio de cultivo: A) PDA, B) 19.5 g de PDA, C) Homogenización del PDA con agua destilada, D) Colocación del matraz con la mezcla en el autoclave y E) Autoclave programada en un ciclo de 40 minutos. 49

Figura 3.23 - A) Distribución del medio de cultivo en cajas Petri y B) Cajas Petri utilizadas. 49

Figura 3.24 - Aislamiento: A) Muestra de corona, B) Toma de muestras a 16 mm^2, C) Esterilización, D) Rotulado de las cajas, E) Siembra, F) Sellado de las cajas, G) Muestra de hoja, H) Toma de muestras a 16 mm^2 y I) Aislados realizados en M1, M2, M3 y M4..... 51

Figura 3.25 - Aislados de las muestras obtenidas en campo. 51

Figura 3.26 - Muestra con características morfológicas similares al género *Neopestalotiopsis* spp. 52

Figura 3.27 - A) Medio de cultivo y B) PDA preparado. 53

Figura 3.28 - Siembra en cajas Petri: A) Esterilización del asa, B) Extración del inóculo y C) siembra en el nuevo medio. 54

Figura 3.29 - Incubación de las muestras provenientes de M2. 54

Figura 3.30 - Crecimiento fúngico con características macroscópicas aparentemente de *Neopestalotiopsis* spp. 55

Figura 3.31 - Preparación de la muestra para la identificación del fitopatógeno con agua destilada: A) Gota de agua destilada en el portaobjetos, B) Medio de cultivo esporulado y C) Colocación del inóculo en el portaobjetos. 56

Figura 3.32 - Preparación de la muestra para la identificación del fitopatógeno con azul de metileno: A) Gota de azul de metileno en el portaobjetos, B) Medio de cultivo esporulado, C) Colocación del inóculo en el portaobjetos y D) Fijación de la muestra con el cubreobjetos. 57

Figura 3.33 - Inoculación directa: A) Desinfeción del tallo de la planta, B) Realización de los cortes con el bisturí a la altura de 3 cm a partir del nivel del suelo, C) Con la ayuda de otro bisturí realizar los cortes en el PDA infectado, D) Colocación del corte de PDA infectado en la herida que se realizó en la planta y E) Cubrir la herida con cinta Floraltexl®. 58

Figura 3.34 - Arreglo de los tratamientos en campo. 59

Figura 3.35 - Tratamientos utilizados: A) Tratamiento 1, B) Tratamiento 2, C) Tratamiento 3 y D) Tratamiento 4. 61

Figura 3.36 - Atomizadores para la aplicación de los tratamientos. 62

Figura 3.37 - A) Aplicación en drench y B) Aplicación vía foliar. 62

Figura 3.38 - Cálculos de los tratamientos utilizados: A) Tratamiento 1, B) Tratamiento 2, C) Tratamiento 3 y D) Tratamiento 4. 64

Figura 3.39 - Plantas inoculadas por método incisión en el tallo. 66

Figura 3.40 - Aislados: A) *Trichoderma* spp. y B) *Neopestalotiopsis* spp. 67

Figura 3.41 - A) Bioensayo de *Trichoderma* spp. y *Neopestalotiopsis* spp. 68

Figura 4.1 - A) Microscopía a 40x, B) Microscopía a 100x y C) Crecimiento de colonias en PDA. 73

Figura 4.2 - *Neopestalotiopsis*: A) Conidiomas esporulados en PNA, B) Conidiomas en PDA, C-D) Células conidiógenas y E-J) Conidios (barra de escala = 10 µm) 74

Figura 4.3 - A) En la parte superior, el micelio del patógeno cultivado en medio PDA presentó un color beige algodonoso con bordes ondulados, B) Por el reverso, el micelio presentó un color miel pálido y C) Los conidios son elipsoidales, multiseptados con apéndices apicales y basales..... 75

Figura 4.4 - Características morfológicas de las especies *Neopestalotiopsis* cultivadas en PDA durante 7 días a 25 °C, las barras de escala representan 20 µm 75

Figura 4.5 - Pruebas de patogenicidad y virulencia: A) Síntomatologia causada por *Neopestalotiopsis* spp. y B) Planta muerta..... 77

Figura 4.6 - Aislamiento de las pruebas de patogenicidad y virulencia: A) Crecimiento de colonias en PDA y B) Microscopía a 40x..... 77

Figura 4. 7- Pruebas de antagonismo a las 148 horas desde el momento de la siembra de ambos hongos..... 78

Figura 4.8 - Pruebas de antagonismo con porcentaje de inhibición del 80%. 79

Figura 4.9 - Pruebas de antagonismo para reducir la incidencia de *Pestalotiopsis* spp. 80

Figura 4.10 - Porcentaje de mortalidad de plantas pasados 30 días desde el inicio de la aplicación de los tratamientos. 81

Figura 4.11 - Prueba de significancia de Tukey con un 95% de confianza para el grado de severidad por tratamiento a los 10 días de aplicados los productos. 83

Figura 4.12 - Prueba de significancia de Tukey con un 95% de confianza para el grado de severidad por tratamiento a los 20 días de aplicados los productos. 85

Figura 4.13 - Prueba de significancia de Tukey con un 95% de confianza para el grado de severidad por tratamiento a los 30 días de aplicados los productos. 88

Figura 7.1 - Grado de severidad a los 10 días de aplicados los productos. 103

Figura 7.2 - Grado de severidad a los 20 días de aplicados los productos. 103

Figura 7.3 - Grado de severidad a los 30 días de aplicados los productos. 103

Símbolos y/o abreviaturas

N	Norte
msnm	Metros sobre el nivel del mar
***F*.**	*Fragaria*
T	Tratamiento
R	Repetición
g	Gramos
ml	Mililitros
L	Litros
cm	Centímetros
dS/m	Decisiemens por metro
CE	Conductividad eléctrica
ºC	Grados Celsius
PDA	Potato Dextrose Agar
mm^2	Milímetros cuadrados
Pza	Pieza
ha	Hectárea
ddt	Días después del trasplante
t	Toneladas

Glosario

Acérvulos: son estructuras reproductivas asexuales presentes en hongos imperfectos, aparecen como un conjunto de hifas formadoras de conidios estrechamente empaquetados sobre una superficie cóncava del micelio del hongo dando aspecto almohadillado. Cuando los produce un hongo parásito de un vegetal suele aparecer por debajo de la cutícula de éste y los conidios se diseminan cuando las condiciones ambientales son favorables, rompiendo el tejido vegetal (Furnari et al., 2014).

Atrofia: es una disminución del tamaño de la célula por pérdida de sustancias celulares. Es una forma de respuesta adaptativa que afecta a las células de un órgano o tejido, y consiste en la reducción de los componentes estructurales de la célula (Orellana y Enríquez, 2021).

Agricultura sustentable: es un sistema alternativo al que intenta reemplazar los factores externos de producción con otro sistema producido en la explotación, la idea es la sostenibilidad e implica beneficiarse de los productos agrícolas, y producir alimentos saludables para las generaciones presentes y futuras a precios razonales para los consumidores y suficientes para sostener la economía del sector agrícola (Villalba y Fuentes, 1994).

Enfermedad: es un estado o condición que se da cuando las plantas sufren cambios anormales en la forma, fisiología, integridad o comportamiento, lo cual resulta en la alteración parcial o muerte de la planta o de sus órganos (Peña y Páez, 2011).

Fitopatógeno: causan enfermedades en las plantas mediante el debilitamiento del hospedante a causa de la absorción del alimento de sus células para su uso, la

alteración del metabolismo de las células hospedantes debido a la secreción de toxinas, enzimas o sustancias reguladoras del crecimiento, el bloqueo de la translocación de los nutrientes minerales, alimentos y agua a través de los tejidos conductores y el consumo del contenido de las células del hospedante, con las que entran en contacto (Peña y Páez, 2011).

Hongo: son organismos unicelulares o pluricelulares y eucariontes, se desarrollan en condiciones como sitios húmedos y con poca luz. Por otro lado, las células de los pluricelulares se agrupan en filamentos llamados hifas que en conjunto recibe el nombre de micelio (Peña y Páez, 2011).

Inoculación: es la introducción voluntaria o accidental, por una herida en las plantas, de igual manera se llama así a la introducción de una sustancia en tejidos vivos o en medios de cultivo (Alpízar, 2014).

Microorganismos: se reconocen tres dominios como la forma de organización de estos seres vivos: 1) Bacterias, denominadas al principio “bacterias verdaderas” o eubacterias; 2) Arqueas (Archaea o arqueobacterias), entre las que se incluyeron inicialmente bacterias que habitan en ambientes extremos; y 3) Eucariontes (Eucarya), dominio en el que se encuentran hongos, levaduras, algas y protozoarios (Sánchez et al., 2017).

Necrosis: deterioro estructural o funcional de los tejidos por la muerte de sus células (Rivera y Wright, 2020).

Patogenicidad: son mecanismos por medio de los cuales los microorganismos causan enfermedad, aunque no todos los microorganismos tienen la misma

probabilidad de causar infección y subsecuentemente enfermedad (Molina et al., 2003).

Rizosfera: es la zona del suelo donde se encuentra la raíz, la cual destaca por una alta actividad microbiana debido a que las raíces excretan cantidades considerables de azúcares, aminoácidos, hormonas y vitaminas (Sánchez y Trigos, 2013).

Síndrome o cuadro: es el conjunto de síntomas y/o signos de una enfermedad que permiten el diagnóstico de esta (Llerena, 2005).

Virulencia: es el grado en el que se expresa la patogenicidad (Molina et al., 2003).

INTRODUCCIÓN

El cultivo de fresa en México inició en 1950 por la creciente demanda de los Estados Unidos (Cih et al., 2018). El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, indica que en el año 2022 se sembraron 12 738.92 ha de fresa, de las cuales se cosecharon 12 546.64 ha, produciendo 539 610.83 t, con un rendimiento de 43.01 t/ha. No obstante, la fresa se cultiva en 12 estados de la República Mexicana; sin embargo, solamente Michoacán, Baja California y Guanajuato abarcan el 91.55% de producción (Santoyo y Martínez, 2009).

A pesar de ser un cultivo de relevancia económica, la fresa no está exenta del ataque de enfermedades y plagas. De hecho, se reporta como susceptible a patógenos de carácter fungoso, los cuales tienen un manejo fundamentado en el uso de químicos (Cano, 2013). *Neopestalotiopsis* spp. es una enfermedad fúngica de reciente ingreso en México, que se ha encontrado afectando a cultivos de fresa, provocando muertes regresivas, cánceres en los tallos y las bases de las plantas y por ende afectando significativamente el rendimiento del cultivo (Rebollar, 2020). En este contexto, la *Neopestalotiopsis* spp. es tratada con Cyprodynil + Fludioxonil, Boscalid + Pyraclostrobin y Azoxistrobina + Difenoconazole (Pérez et al., 2021).

De acuerdo con INTAGRI (2022), *Phytophthora* spp. o *Colletotrichum* spp. llegan a confundirse con *Neopestalotiopsis* spp., por lo que un diagnóstico en el laboratorio es esencial para determinar la enfermedad.

Con base a estos antecedentes, en la presente investigación se evaluaron cuatro tratamientos (un químico y tres orgánicos) para determinar el de mayor efectividad para el control de *Neopestalotiopsis* spp. debido a que esta ha tenido un impacto negativo en la producción y calidad del cultivo de fresa como consecuencia de la mortalidad que ocasiona y de su rápida diseminación.

I. GENERALIDADES DEL PROYECTO

1.1 Planteamiento del problema

En los últimos años, se han presentado nuevos problemas fitosanitarios en el cultivo de fresa, como es el caso de la incidencia de *Neopestalotiopsis* spp., que ha tenido gran impacto negativo en la producción y calidad de este cultivo, así como grandes pérdidas económicas debido a la mortandad del cultivo y a la rápida propagación del hongo. Conjuntamente, se tiene un mal manejo por el desconocimiento de productos para el control de la enfermedad, así como la falta de herramientas para combatir y contrarrestar los daños ocasionados por este nuevo patógeno.

1.2 Justificación

El uso de productos orgánicos (de origen natural) son una alternativa a las moléculas de síntesis química para controlar enfermedades fúngicas que causan mortalidad o merman la calidad y producción de cultivos agrícolas. Además de ser económicos los productos orgánicos tienen algunas ventajas cuando son aplicados correctamente, entre ellas la conservación del medio ambiente (fácilmente degradables), la protección de organismos benéficos y baja toxicidad hacia organismos no blanco.

Neopestalotiopsis spp. es considerado un hongo saprófito, es un fitopatógeno que causa severos daños en coronas y raíces en plantas de fresa, lo que conlleva a la pérdida de la producción y afectando la economía del productor. El control de esta enfermedad se basa en el uso de productos de síntesis química tales como Cyprodynil, Fludioxonil, Pyraclostrobin, Boscalid y Azoxistrobina, debido a ello se considera importantes encontrar alternativas orgánicas que coadyuven a mejorar el estatus fitosanitario de los cultivos de fresa en México.

1.3 Hipótesis

Los productos orgánicos presentarán mayor efectividad en el control de *Neopestalotiopsis* spp. en comparación con el control químico.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar el tratamiento con mayor efectividad en el control de *Neopestalotiopsis* spp. en el cultivo de fresa.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar el grado de severidad ocasionado por *Neopestalotiopsis* spp. en el cultivo de fresa.
- Comparar el porcentaje de mortalidad entre los tratamientos empleados para el control de *Neopestalotiopsis* spp.
- Evaluar el porcentaje de inhibición de *Neopestalotiopsis* spp. por *Trichoderma* spp. mediante pruebas de confrontación dual.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Cultivo de fresa

La fresa es una planta perteneciente a la familia Rosaceae. Las que se cultivan actualmente se derivan de un cruce de dos especies: la *Fragaria virginiana* y la *Fragaria chiloensis* (Bianchi, 2018).

De acuerdo con Santoyo y Martínez (2009), existen numerosas variedades de fresa que se clasifican en día corto y neutrales, lo cual indica que las primeras forman sus brotes en invierno, cuando los días se hacen cortos y las temperaturas bajan, por lo que florecen en primavera. Por otra parte, las variedades neutrales son insensibles a la longitud del día y producen fruta en la temporada en que las temperaturas son más bajas.

La reproducción de las plantas de fresa se lleva a cabo de forma asexual, a partir de estolones que provienen de una “planta madre” con características genéticamente identificadas y definidas, así mismo se comercializan a raíz desnuda (estolón) y por cepellón (INTAGRI, 2018).

2.1.1 Importancia del cultivo

México se posiciona en el noveno lugar como productor y el octavo como exportador de alimentos, lo que favorece la apertura de múltiples acuerdos internacionales que permiten la comercialización de productos agroalimentarios (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria [CEDRSSA], 2020).

La producción nacional de fresa ha crecido a un ritmo del 12.22% entre el año 2005 a 2019, destacando el mayor crecimiento en el estado de Michoacán, con un 15.71% (González et al., 2019). La fresa es un cultivo exitoso, ya que el 52.21% de la producción nacional se destina al mercado externo, posicionando a México como el tercer proveedor de fresa fresca al mercado internacional (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA], 2017).

2.1.2 Taxonomía del cultivo

La planta de fresa presenta la taxonomía descrita en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 - Clasificación taxonómica de la fresa.

Categoría	Descripción
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnolipsida
Orden:	Rosales
Familia:	Rosaceae
Subfamilia:	Rosoideae
Tribu:	Potentilleae
Subtribu:	Fragariinae
Género:	*Fragaria*
Especie	*ananassa* Duch

Fuente: Olivera (2012).

2.2 Descripción botánica

De acuerdo con Tonelli (2010), la planta de fresa es herbácea, estolonífera, de bajo porte, destacando su sistema radicular fibroso que alcanza 30 a 50 cm de profundidad, formado por raíces principales engrosadas y de raicillas finas, de color claro, agrupadas en ramificaciones laterales. En la Figura 2.1 se puede observar la morfología típica de una planta de fresa, una planta madre que da origen a un estolón, la frutilla característica y la flor de donde se origina.

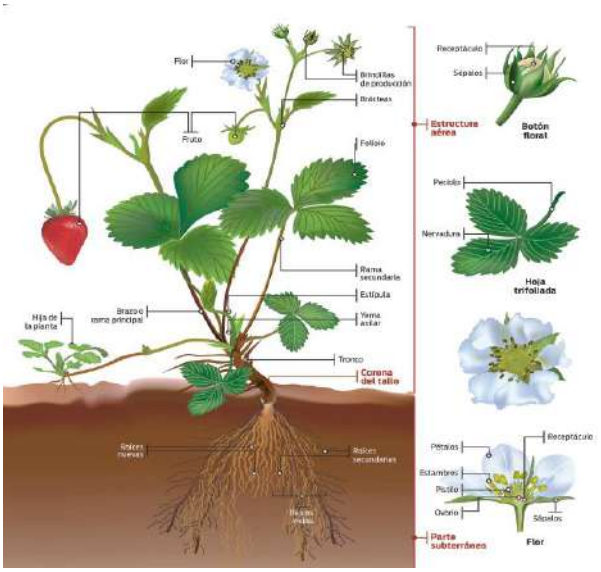


Figura 2.1 - Morfología de la fresa (Bolda et al., 2015).

2.2.1 Corona

Bolda et al. (2015) refieren a la corona como la parte central de la planta, la cual descansa sobre la superficie del suelo y forma las raíces a la base. En el mismo sentido refiere a un tallo comprimido del cual las yemas axilares se forman produciendo crecimientos vegetativos y ramilletes de flores.

2.2.2 Hojas

Quiroz y Mendoza (2018) mencionan que las hojas están dispuestas en forma de roseta y largamente pecioladas provistas de dos estipulas rojizas con un limbo dividido en tres foliolos con bordes acerrados los cuales se insertan en la corona.

2.2.3 Flores

Las flores se presentan como inflorescencias de tipo corimbo o racimos, perfectas o hermafroditas, destacando una corola formada por cinco pétalos blancos, cáliz persistente formado por cinco sépalos (Tonelli, 2010).

2.2.4 Fruto

Baraona y Sancho (1998) describen al fruto como una infrutescencia carnosa, sin embargo, los verdaderos frutos son las semillas que lo recubren conocidos como aquenios, los cuales a su vez producen hormonas que estimulan el engrosamiento del receptáculo floral.

La fresa es muy sensible al manejo en el momento de cosecha, por lo que debe ser recolectada de forma manual (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural [SADER], 2020), temprano por la mañana y se debe evitar cosechar cuando se tengan altas temperaturas (INTAGRI, 2016).

2.3 Requerimientos edafoclimáticos

2.3.1 Requerimientos edáficos

Brown (2018) sostiene que el mejor suelo para el desarrollo de la fresa es el suelo arenoso limoso a suelo limoso caracterizados por facilitar un adecuado drenaje y proveer importantes niveles de materia orgánica.

Además, las plantas requieren un suelo con un pH de 5.5 a 6.5. Por otro lado, es conveniente, evitar los suelos compactados propicios a los estancamientos de agua

y con una oxigenación escasa, donde la actividad de enraizamiento se limita desencadenando podredumbres en las raíces (Bianchi, 2018).

2.3.2 Requerimientos climáticos

Undurraga y Vargas (2013) puntualizan que la fresa se desarrolla mejor en climas templados, sin vientos ni heladas en primavera, y sin lluvias ni elevadas temperaturas en épocas de cosecha, lo cual se ve reflejado en un alto rendimiento. Así también diversos autores hacen referencia a que el grado de desarrollo vegetativo y la floración depende de factores como el frío recibido antes de su plantación, fotoperíodo y temperaturas durante el desarrollo.

2.3.3 Requerimientos hídricos

El cultivo de fresa requiere de una gran humedad con un agua libre de sales y una conductividad eléctrica (CE) inferior a 0.8 dS/m, para permitir una alta producción y evitar problemas con sodio, calcio, boro o cloruros que pueden producir graves daños en el desarrollo del cultivo, cómo las observadas en la Figura 2.2 dónde se aprecia la comparación entre plantas cultivadas en condiciones de CE superiores al valor mencionado (cuatro plantas a la izquierda) y una planta cultivada en condiciones adecuadas de este mismo parámetro (Undurraga y Vargas, 2013).

Figura 2.2 - Daño ocasionado por la salinidad del suelo en plantas de fresa. Planta sana a la derecha y plantas afectadas a la izquierda (INTAGRI, 2017).

2.3.4 Requerimientos nutricionales

De acuerdo con Sandoval y Ramírez (2014), la cantidad de fertilizantes para preparar una solución nutritiva apta para el desarrollo del cultivo se describe en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 - Fertilizantes para preparar mil litros de solución nutritiva.

Fertilizante	Gramos por cada 1000 litros de agua
Nitrato de calcio	531 g
Nitrato de potasio	152 g
Sulfato de potasio	130 g
Sulfato de magnesio	246 g
Fosfato monopotásico	68 g
Mezcla de micronutrientes	9 g
Quelato de hierro (7%)	9 g
Ácido sulfúrico	40 ml

Fuente: Sandoval y Ramírez (2014).

2.4 Enfermedades en el cultivo de fresa

El cultivo de fresa se ha visto afectado desde hace varios años por un gran número de enfermedades y plagas, afectando la calidad del fruto, su producción y rendimiento. Los problemas fitosanitarios son variables año con año según las condiciones climáticas, cultivares utilizados y prácticas del cultivo. Por ello surge la imperativa necesidad de utilizar medidas culturales, biológicas y químicas que ayuden a aminorar estas problemáticas (Giménez et al., 2003). La principal enfermedad de este cultivo es la secadera de la fresa, en el estado de Guanajuato causa pérdidas de hasta el 50 % de la producción (Mariscal et al., 2017).

2.4.1 Mancha angular por *Xanthomonas fragariae*

Esta enfermedad también conocida como mancha angular es causada por una bacteria bacilar (Figura 2.3) que produce manchas en la cara inferior de las hojas, que al inicio son pequeñas, de color verde claro, con aspecto húmedo (Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria [CIPF], 2016).

Obregón et al. (2020) señalan que sobre las manchas se observa una mucosidad color rojo óxido que corresponde a la bacteria, en la Figura 2.4 se puede apreciar los signos propios de las *Xanthomonas* en un foliolo de fresa, además las hojas jóvenes, sanas y vigorosas son más susceptibles a enfermarse.

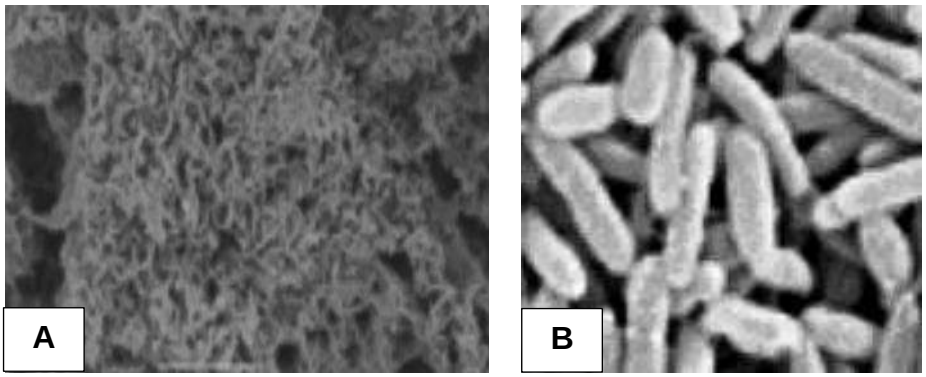


Figura 2.3 - Morfología de *Xanthomonas fragariae*: A) Células bacilares en una colonia y B) Células bacilares con hebras algodonosas (Saavedra et al., 2018).

Figura 2.4 - Signos avanzados de mancha angular (Giménez et al., 2003).

2.4.2 Marchitamiento por *Fusarium* spp.

De acuerdo con Bolda y Koike (2013), la marchitez en fresa es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. spp. *fragariae*. Del mismo modo mencionan que este hongo puede sobrevivir por varios años en el suelo a través de unas estructuras llamadas clamidosporas (Figura 2.5 A), las cuales se distribuyen por el trasporte de suelo contaminado durante el labrar y preparación del campo.

Esta enfermedad puede ocasionar pérdidas de hasta el 50% de la producción (Guerrero, 2013). Entre los signos más comunes destaca enanismo, marchitez, necrosis y muerte, ocasionalmente, las coronas de las plantas afectadas presentan necrosis vasculares y corticales con colores oscilantes entre naranja y marrón

oscuro (Pastrana et al., 2014). En la Figura 2.6 se observa el daño en el fruto de fresa ocasionado por *Fusarium oxysporum*.

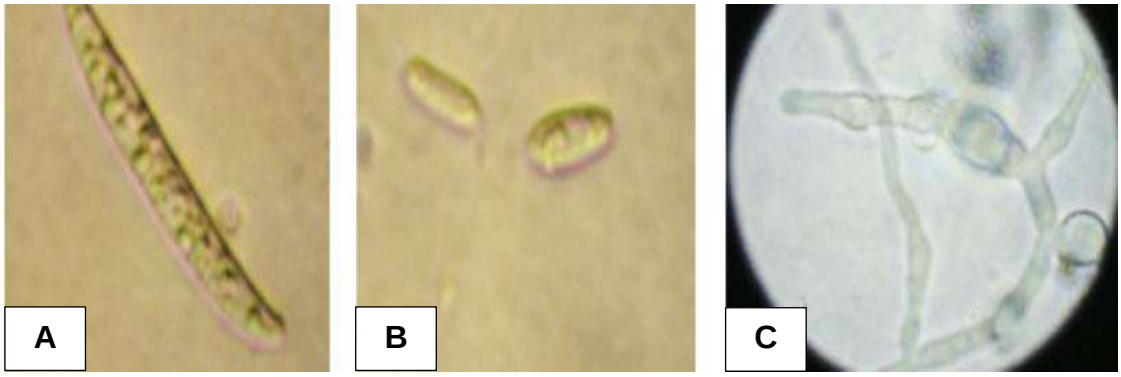


Figura 2.5 - Crecimiento de las colonias: A) Microconidio, B) Clamidosporas y C) Hongo *Fusarium oxysporum* (Retana et al., 2018).

Figura 2.6 - Daños por *Fusarium oxysporum* en frutos (Guerrero, 2013).

2.4.3 Marchitamiento por *Verticillium dahliae*

Giménez et al. (2003) señalan que el patógeno permanece en el suelo durante mucho tiempo mediante estructuras de resistencia llamadas microesclerocios (Figura 2.7), atacan solanáceas, crucíferas y malezas de hoja ancha. La enfermedad se ve favorecida cuando las plantas están en situación de estrés, con temperaturas entre 25 y 28 °C, las esporas se diseminan con el agua y viento.

Las plantas de fresa infectadas por este hongo presentan una falta de crecimiento o desarrollo, marchitez en las hojas más viejas (Figura 2.8 A) y las hojas jóvenes

permanecen erguidas (Figura 2.8 B) las plantas pueden presentar amarillez, y la mayoría de ellas se secan por completo. Los daños en la corona se observan como una necrosis vascular, y no causan daños visibles a las raíces. Las pérdidas se deben al debilitamiento de las plantas con la pérdida de producción y menor tamaño de los frutos, lo que repercute en la calidad de estos (Figura 2.8 C) (Martín et al., 2019).

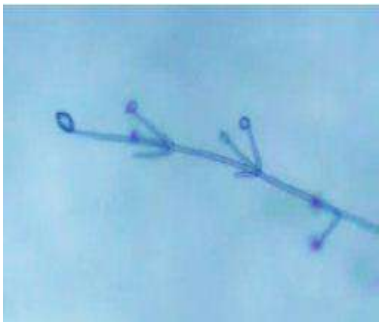


Figura 2.7 - Conidióforos de *Verticillium dahliae* (Martín et al., 2019).

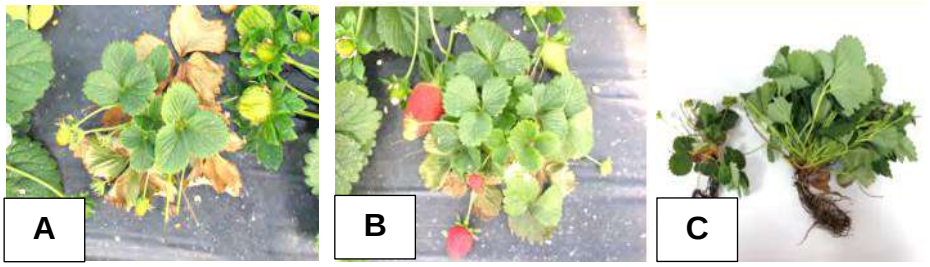


Figura 2.8 - Signos de *Verticillium dahliae*: A) Marchitez en hojas viejas, B) Planta con signos iniciales de marchitez y C) Comparación de tamaños entre plantas enfermas y sanas (Martín et al., 2019).

2.4.4 Podredumbre de corona por *Rhizoctonia* spp.

Es un hongo que ataca a diversos cultivos, llegando a permanecer por varios años en el suelo mediante estructuras de resistencia (Figura 2.9). Entre sus daños destacan la podredumbre de corona, raíces negras y muerte de plantas. La podredumbre aparece en cualquier parte de la corona, casi siempre como una lesión

entrante a la misma, que afecta también al tejido vascular (Figura 2.10) (Giménez et al., 2003).

De igual manera, se encuentran lecciones en la corona de color oscuro, sin un patrón definido de tamaño o lugar y la base del peciolo se oscurece y se desprende con facilidad (Obregón et al., 2020).

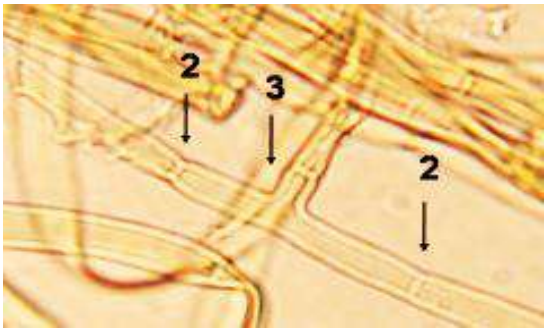


Figura 2.9 - Características morfológicas de *R. solani*: 1) Constricción, 2) Septas y 3) Ramificación en ángulo recto (Díaz et al., 2014).

Figura 2.10 - Síntoma de podredumbre de corona ocasionada por *Rhizoctonia* spp. (Obregón et al., 2020).

2.4.5 Podredumbre de corona y fruto por *Phytophthora capsici*

Es un oomiceto, cuyas oosporas (Figura 2.11) son las responsables directas de pérdidas económicas altas en el cultivo de la fresa, que se ve favorecido por la humedad relativamente alta, humedad abundante del suelo y la temperatura de 25 a 30 °C aumentan la severidad. Las plantas hospedantes infestadas muestran

marchitamiento, clorosis y resquebrajamiento de tallo, daños en coronas (Figura 2.12), por lo que se debilitan y quedan expuestas a ser atacadas por otros patógenos (Serret et al., 2016).

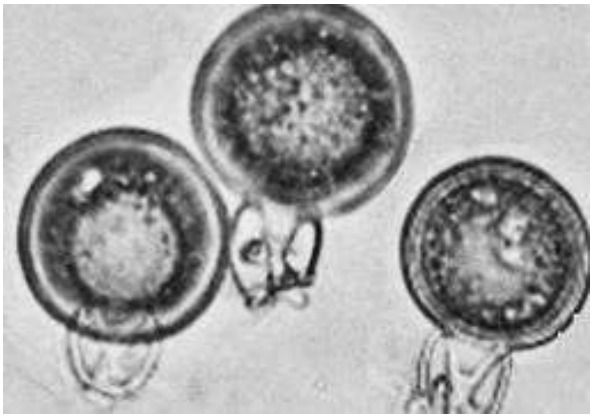


Figura 2.11 - Oosporas de *Phytophthora capsici* (Sánchez et al., 2019).

Figura 2.12 - Podredumbre de corona ocasionada por *Phytophthora* (Giménez et al., 2003).

2.4.6 Podredumbre de frutos por antracnosis

Antracnosis es una enfermedad sumamente destructiva que ocurre esporádicamente, teniendo como resultado la reducción de la productividad, fruta con lesiones que no puede ser comercializada o incluso la muerte de las plantas. La severidad depende del grado en el que las plantas están infectadas con el

patógeno y la cantidad de riego por aspersión y de lluvia que cae sobre el cultivo, lo que provoca su fácil diseminación (Bolda et al., 2017).

Obregón et al. (2020) indican que los signos principales de antracnosis se reflejan en los daños a peciolos, estolones y pedúnculos florales (Figura 2.13), lo cual causa lesiones ovaladas de color oscuro y rojizo alrededor, y es fácil de observar en ocasiones masas de conidios en el centro. De igual manera provoca la pudrición de frutos y daños en la corona, hojas y flores.

Figura 2.13 - Signos de antracnosis*:* A) Daños en peciolo y B) Pudrición de frutos (Obregón et al., 2020).

2.4.7 Podredumbre de frutos por *Botrytis cinerea*

Bolda y Koike (2016) mencionan que el hongo de moho gris (*Botrytis cinerea*) es el de mayor importancia en regiones del mundo donde se cultiva la fresa, *Botrytis cinerea* se encuentra causando pérdidas significativas en cosecha y postcosecha debido a que se desarrolla tanto en campo como en almacenaje, además es uno de los patógenos más difíciles de controlar cuando las condiciones ambientales favorecen su crecimiento y desarrollo.

Los signos comienzan con manchas en los frutos de color marrón y que con el tiempo se cubren de un moho de color gris (Figura 2.14), el cual puede afectar completamente al fruto; los frutos más afectados son aquellos que rozan el suelo, o aquellos en contacto con frutos infectados (Obregón et al., 2020).

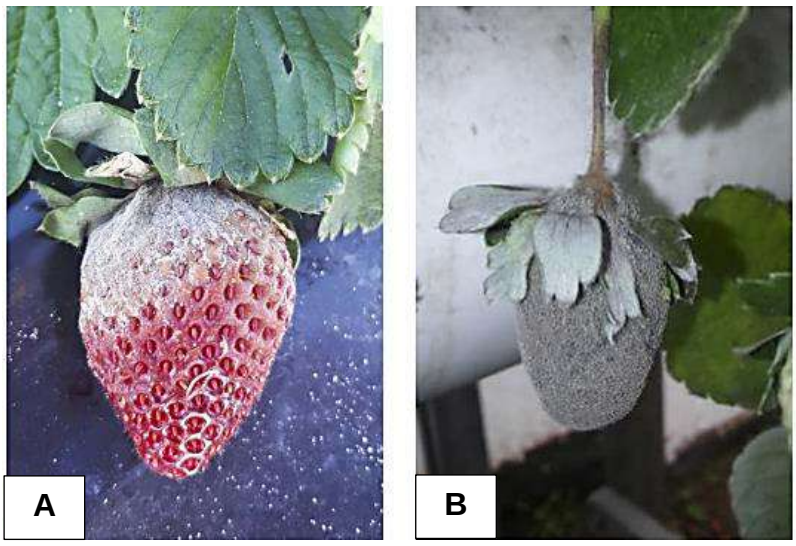


Figura 2.14 - Podredumbre del fruto ocasionada por *Botrytis cinerea*: A) Daños en fruto y B) Micelio en fruto (Obregón et al., 2020).

Botrytis cinerea produce grandes números de esporas de células simples que se extienden fácilmente por el aire, las salpicaduras de agua, y contacto físico. En la Figura 2.15, se pueden observar estas estructuras en un aumento de 400x a su tamaño original (Bolda y Koike, 2016).

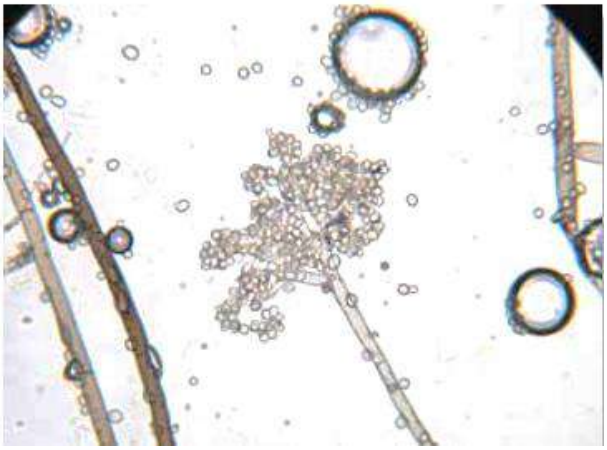


Figura 2.15 - Observación de *Botrytis cinerea* en microscopio (Bolda y Koike, 2016).

2.4.8 Podredumbre de raíces por *Phytium* spp.

De acuerdo con Obregón et al. (2020), *Phytium* spp. es un hongo cosmopolita que por lo general se encuentra en el suelo y se asocia con *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp. y otros. Los principales signos es la podredumbre de las raíces, las raíces adventicias se pelan fácilmente y se vuelven de color oscuro como se muestra en la Figura 2.16.

Figura 2.16 - Podredumbre radicular por *Phytium* (Obregón et al., 2020).

2.5 *Neopestalotiopsis* spp.

Neopestalotiopsis spp. es un hongo, fitopatógeno asociado a la podredumbre de la raíz y corona en fresa. Este hongo ataca primordialmente al follaje y raíz del cultivo. Se ha visto que los daños tienen la posibilidad de ser más severos una vez que la planta se encuentra debilitada por factores abióticos, es decir el mal manejo nutritivo, control de plagas, condiciones de riego, entre otros, son de suma importancia para combatir la enfermedad. *Neopestalotiopsis* spp. tiene una etapa saprofítica, lo que beneficia su diseminación, además de tener la función de conformar acérvulos, simples de esparcir por el aire. Si bien en el proceso de

infección aparecen conidios, abajo de la cutícula del hongo y sencillos de diseminar por lluvia y aire, es bastante común que la infección se extienda por el riego y salpicaduras de lluvia. Además, las temperaturas entre 23°C y 29°C son favorables para el desarrollo del hongo (Rebollar, 2020).

Pérez et al. (2021) identificaron aislados de fresa con *Neopestalotiopsis* en informes que describen un patógeno de raíces y coronas de fresa, en durante las últimas dos recientes temporadas de fresas (2018-19 y 2019-20). Se reportaron brotes severos en campos comerciales de Florida, EE. UU., donde se observaron signos en raíces, corona, pecíolo, frutos y hojas. El rendimiento se vio gravemente afectado y se destruyeron acres de campos de fresas. Los estudios realizados indican que los aislamientos de los brotes recientes son más agresivos y pueden pertenecer a una nueva especie de *Neopestalotiopsis* spp.

Wu et al. (2020) definen algunos signos de la enfermedad en plantas de fresa, tales como necrosis de color marrón con acérvulos negros en las hojas (Figura 2.19 A), necrosis ligeramente de color marrón oscuro en los estolones y necrosis de color marrón rojizo en la fruta. El tejido de la corona enferma (Figura 2.19 B) mostró necrosis marmórea de color marrón rojizo con un margen de color marrón oscuro, y las plantas con pudrición severa de la corona mostraron una decoloración de color marrón rojizo en las hojas (las hojas inicialmente se volvieron de color marrón rojizo entre las nervaduras y podrían quemarse por completo en etapas posteriores).

La enfermedad avanza hacia la corona e infecta el cuello de la planta, la presencia de manchas necróticas se va extendiendo y van pudriendo el tejido hasta llegar a la raíz; el hongo puede llegar a infectar los frutos, causando pudrición blanda (INTAGRI, 2022).

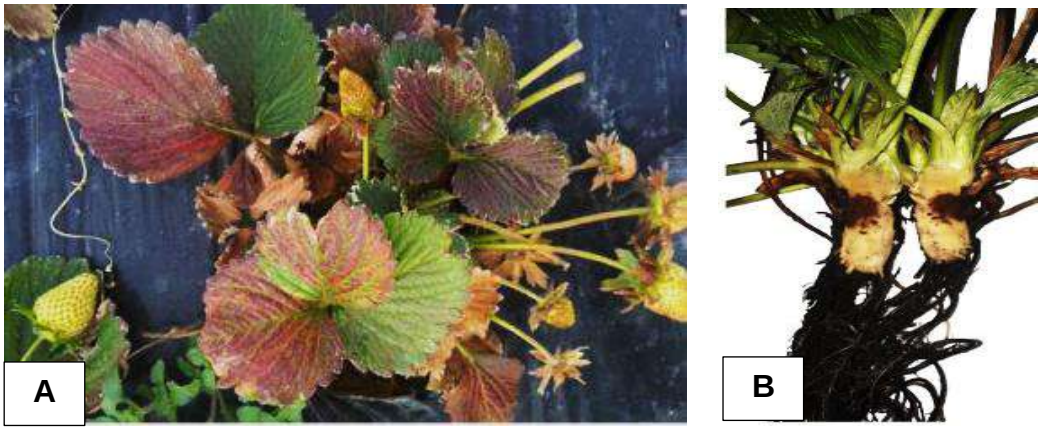


Figura 2.17 - Signos de *Neopestalotiopsis* spp.: A) Daño en hojas y B) Daño en corona y raíces (Obregón et al., 2020).

Machín (2017) señala que *Neopestalotiopsis* spp. presenta crecimiento micelial algodonoso de color blanco y con borde ondulado cuando es cultivada en medio sólido (*in vitro*) (Figura 2.20 A) y a los 10 días de crecimiento se observan acérvulos de color negro (Figura 2.20 B).

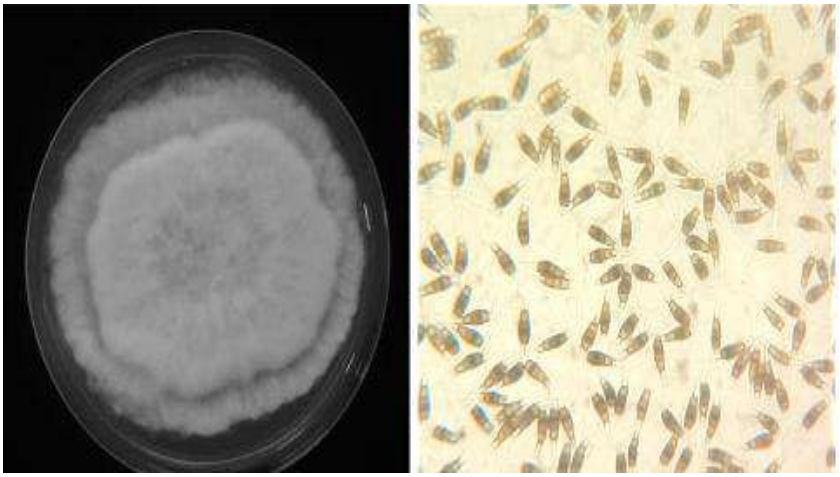


Figura 2.18 - Crecimiento de *Neopestalotiopsis clavispora* en medio de cultivo PDA y su estructura (Machín, 2017).

2.5.1 Taxonomía de *Neopestalotiopsis* spp.

De acuerdo con la Academia de Ciencias de California (2022), la taxonomía de *Neopestalotiopsis* spp. se describe en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 - Taxonomía de *Neopestalotiopsis* spp.

Categoría	Descripción
Reino:	Fungí
Filo:	Ascomycota
Subfilo:	Pezizomycotina
Clase:	Sordariomycetes
Subclase:	Xylariomycetidae
Orden:	Amphisphaeriales
Orden:	Potentilleae
Género:	*Neopestalotiopsis*

Fuente: California Academy of Sciences (2022).

2.6 Control

2.6.1 Control cultural

Previo al establecimiento del cultivo de fresa en la parcela, INTAGRI (2022) recomienda acolchar el suelo húmedo con plástico transparente durante los meses de mayor humedad y radiación, con el fin de solarizar el suelo, así como la biofumigación con enmiendas orgánicas y residuos ricos en amonio y nitratos, además de implementar estrategias biorracionales y culturales para un manejo integrado del cultivo cuando es bajo agricultura convencional en suelo. En la

modalidad de agricultura protegida, tales como túneles se recomienda colocar los plásticos lo antes posible, para evitar la dispersión del hongo por lluvias, además el manejo correcto de la nutrición es importante, ya que evita el estrés y la susceptibilidad de la planta ante el ataque de patógenos.

2.6.2 Control químico

Neopestalotiopsis clavispora es el agente causal de la podredumbre de la corona de la fresa, en investigaciones previas, esta enfermedad ha sido tratada con Captan (83%), Clorotalonil (72%), Iprodione (50%), Carbendazim (50%), Boscalid + Pyraclostrobin (12.8% + 25.2%), Azoxistrobina + Difenoconazole (20% + 12.5%) y Cyprodynil + Fludioxonil (37.5% + 25%) a dosis comerciales, sobre el crecimiento micelial, es decir aplicaciones curativas en plantas de fresa. Los fungicidas que mostraron mayor efectividad en el porcentaje de inhibición de crecimiento fueron Cyprodynil + Fludioxonil (80,1%), Boscalid + Pyraclostrobin (77,69%) Azoxistrobina + Difenoconazole (75,67%). El resto de los tratamientos arrojaron valores de inhibición de crecimiento muy bajos (Obregón et al., 2020). Esto indica, que no existe variedad de moléculas químicas sintéticas que puedan permitirnos 1) combatir la enfermedad, 2) rotar mecanismos de acción, 3) utilizarlas en su totalidad, debido a que algunas no están permitidas para su uso en México o han generado resistencia.

2.6.3 Control biorracional

De acuerdo con González et al. (2020), los extractos de eucalipto rojo a dosis de 50 ml de infusión (40 g de follaje en 1.5 L de agua) por 1 L de agua aplicados en seis ocasiones son una opción para el control *Neopestalotiopsis* spp. en el cultivo de guayaba. Por otro lado, existen algunas otras alternativas biorracionales de las que

no existe reporte sobre su potencial efecto para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad en cultivos de fresa establecidos en México.

2.6.4 Control biológico

En investigaciones sobre el control de enfermedades mediante diferentes especies de *Trichoderma* spp., se ha encontrado que este hongo reduce la severidad e induce el crecimiento de las plantas (Cubillos et al., 2009), así mismo, las especies de *Trichoderma* spp. presentan mecanismos de control sobre hongos fitopatógenos, a través del micoparasitismo, antibiosis y en competencia por nutrientes y espacio, lo cual controla las enfermedades en los cultivos (Infante et al., 2009).

Morales-Mora et al. (2020) identificaron a *Colletotrichum* spp., *Aspergillus niger* y *Rhizopus stolonifer* asociados al fruto de fresa, *Pestalotiopsis* spp., *Curvularia* spp. y *Alternaria* spp., presentes en hojas y tallos y a *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp., asociados a la raíz del cultivo de fresa. La cepa de *Trichoderma harzianum* mostró capacidad antagónica *in vitro* frente a *Colletotrichum* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Alternaria* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Curvularia* spp., pero no consiguió inhibir el desarrollo de *Rhizopus stolonifer.*

2.7 Suelos supresivos y conductivos

Las enfermedades que ocurren a nivel de suelo incluidas las pudriciones radicales y de la corona, marchiteces y caídas de plántulas, están entre los factores limitantes para alcanzar el potencial de rendimiento de los cultivos agrícolas. Los suelos supresivos corresponden a un fenómeno natural, en cual algunos suelos no permiten o afectan el establecimiento de patógenos o el desarrollo de enfermedades que afectan a diferentes cultivos (Doussoulin-Jara y Moya-Elizondo, 2011).

Baker y Cook (1974) señalan que está puede ser el resultado de distintos mecanismos: a) incapacidad del patógeno para establecerse, b) se establecen, pero no causan signos de la enfermedad en las plantas, y c) se establecen causando signos en plantas inicialmente, pero la gravedad de la enfermedad disminuye con el tiempo, a pesar de que exista el patógeno en el suelo.

Hass y Défago (2005) mencionan que un suelo conductivo corresponde a aquellos suelos que permiten el desarrollo de enfermedades, es decir todo lo opuesto a un suelo supresivo. El suelo conductivo es en el cual el patógeno se instala y provoca enfermedad que con el tiempo va desapareciendo aun cuando el patógeno quede establecido en dicho suelo (Baker y Cook, 1974).

2.8 Investigaciones relacionadas con *Neopestalotiopsis* spp.

Huanaluek et al. (2021) indican que son muchos los hongos *pestalotioide* que comúnmente acontecen como patógenos, endófitos o saprofitos; este grupo fúngico se puede asemejar como un grupo patógeno procedente en diferentes huéspedes y condiciones climáticas. Arzanlou et al. (2012) sostienen que el género *Pestalotiopsis* representa el mayor número de hongos *pestalotioide*.

Maharachchikumbura et al. (2014) catalogaron a varias especies de *Pestalotiopsis* que se transfieren a *Neopestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis*. Mencionan once nuevas especies de *Neopestalotiopsis* y se introducen dos nuevas especies en *Pseudopestalotiopsis*. Además, describieron veinticuatro nuevas especies de *Pestalotiopsis* basado en la filogenia molecular. Por otro lado, deducen que las células medianas versicoloras son la característica distintiva de *Neopestalotiopsis* que la separa de otros géneros *Pestalotioides*, así mismo son los principales patógenos de las plantas que causan manchas en las hojas, pudrición de la fruta y enfermedades de la raíz en varios cultivos.

Machín (2017) realizó investigaciones sobre los organismos asociados a la muerte de plantas de fresa, aisló hongos a partir de la raíz y corona, observando plantas cuyas hojas presentaban márgenes necrosados y en algunos casos hojas completamente necrosadas. Logró identificar seis géneros fúngicos: *Neopestalotiopsis* spp.*, Fusarium, Cylindrocarpon, Rhizoctonia, Macrophomina, Verticillium* y dos oomycetos: *Phytophthora* y *Pythium.* De lo anterior obtuvo que la combinación de organismos más frecuentes fue la de *Neopestalotiopsis* spp. y *Fusarium* spp.

De acuerdo con Baggio et al. (2021), las características morfológicas, los análisis filogenéticos y las pruebas de patogenicidad de aislados de fresa de plantas enfermas en Florida recuperados durante los brotes recientes de *Neopestalotiopsis* spp. fueron genéticamente diferentes y pueden pertenecer a una nueva especie.

Rebollar et al. (2020) determinaron la etiología de la enfermedad *Neopestalotiopsis rosacea*, marcando el primer reporte en cualquier parte del mundo de esta especie infectando fresa.

Las condiciones más favorables para el desarrollo de *Neopestalotiopsis* spp. son una alta humedad con temperatura moderada (alrededor de 23 °C), además la enfermedad puede diseminarse a través de las operaciones que se realizan en el cultivo, por las herramientas, salpicadura de lluvia o por el riego, las cuales penetran en la planta por las heridas o aberturas naturales (Obregón et al., 2020).

Hidrobo-Chávez et al. (2022) mencionan que, en Ecuador, la producción de fresa se ubica en la región andina con una superficie de 1.000 Ha. Albión es el cultivar más popular debido a la forma cónica de la fruta y el tamaño de esta, así como su color rojo brillante y la dulzura. Desde junio de 2014, los agricultores informaron una reducción en el ciclo de producción de 24 meses a 6 a 8 meses y una disminución del rendimiento de alrededor del 50 % debido a un patógeno del suelo desconocido. Los signos de la planta presentaron una decoloración rojiza en las hojas nuevas, atravesando el ápice de la hoja hasta el pecíolo, hasta volverse totalmente marrones en las hojas viejas, lo que provocó la muerte de la planta. Además, se informó una mancha marrón rojiza dentro de la corona de la fresa y pudrición de la raíz.

Los signos de *Neopestalotiopsis* spp. empiezan con un ligero síntoma amarillo en el borde de las hojas viejas y luego se extiende hacia las hojas jóvenes. Las raíces sintomáticas son de color marrón oscuro a negro y el floema del cuello de la raíz se vuelve marrón rojizo (Sun et al., 2021).

Además, se presenta necrosis de color marrón con acérvulos negros en las hojas, ligeramente de color marrón oscuro en los estolones y necrosis de color marrón rojizo en la fruta (Wu et al., 2020). En la inoculación de la corona, los signos se manifiestan primero como atrofia general y un ligero amarillamiento de las hojas exteriores, que pronto colapsan, este patrón continuo hacia el interior de las hojas y termina con el colapso de la planta de 2 a 3 meses después de la inoculación, parte de las raíces de las plantas enfermas son de color marrón a negro, mientras que otras permanecían blancas (Rebollar et al., 2020).

De acuerdo con lo reportado por Essa et al. (2018), la morfología de *Neopestalotiopsis rosae*, diez días después de la incubación *in vitro* a 25°C, los aislamientos se vuelven blanquecinos y color oliváceo en el envés de las placas. Por otro lado, los conidiomas (acérvulos) son en su mayoría solitarios, dispersos y semisumergidos. Así mismo los conidios son fusiformes, ligeramente curvados y con 4 tabiques, la célula apical es desnuda 2 a 3 no ramificada, tubular y los apéndices tenían una longitud de 16 a 23 µm. Consecuentemente la célula basal desnuda sola, céntrica con apéndice no ramificado (4.5 a 7.5 µm de largo).

Por otra parte, la colonia en PDA alcanza 90 mm de diámetro después de 7 días a 21,9 °C, de color amarillento, con un micelio aéreo blanquecino esponjoso, que secreta un pigmento amarillento en el medio de cultivo, con conidiomas aislados esparcidos sobre el micelio aéreo, además se tiene un reverso de color marrón amarillento pálido (Fiorenza et al., 2022).

Rotondo et al. (2022) identificaron que los conidios eran elipsoides a fusiformes, de cinco células, con tres células medianas de color marrón claro y una célula apical y basal hialina. Las células apicales tenían de dos a cuatro apéndices flexibles y la célula basal tenía un apéndice no flexible. Se purificaron dos aislamientos en PDA, produciendo una densa capa de micelio blanco con márgenes ondulados. El color

de la parte inferior de la capa de micelio era naranja rosado, los conidiomas se formaron aleatoriamente en las colonias y expulsaron esporas gelatinosas negras.

Chen et al. (2012) indica que el género *Pestalotiopsis* spp., de acuerdo con sus caracteres morfológicos y características biológicas, mostró que el medio de cultivo óptimo para su desarrollo es potato dextrose agar (PDA), pudiendo utilizarse dextrosa y peptona como las mejores fuentes de carbono y nitrógeno para el crecimiento microbiológico. Del mismo modo se deduce que también es óptimo el medio de cultivo para el crecimiento de *Neopestalotiopsis* spp. debido a que pertenecen al mismo grupo de hongos pestalotioide.

Por otra parte, el filo Ascomycota es uno de los más abundantes en el reino fungí, así mismo la mayoría de los análisis filogenéticos moleculares muestran el filo Ascomycota como un grupo descendiente de Basidiomycota. La mayoría de las especies de Ascomycota, así como la mayoría de los Basidiomycota, viven de plantas como saprobios, parásitos o simbiontes (Berbee, 2001). De acuerdo con lo anterior, la California Academy of Sciences (2022) clasifica a *Neopestalotiopsis* spp. en el filo Ascomycota.

Se ha informado sobre especies similares a *Pestalotiopsis* que afectan a la fresa en todo el mundo, por lo que el estado taxonómico del hongo es confuso porque ha pasado por múltiples reclasificaciones a lo largo de los años (Pérez et al., 2021).

Pérez-Rodríguez et al. (2019) sostienen que los agentes de control biológico y fungicidas ejercen un tipo de control hacia el micelio de los hongos fitopatógenos. Además, los resultados obtenidos en la investigación realizada por los mismos autores demostraron que *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, son una alternativa en el control biológico de enfermedades radiculares fungosas en fresa.

Los fungicidas que tienen mayor efectividad en el porcentaje de inhibición de crecimiento fúngico para el control de *N. clavispora* son: Cyprodynil + Fludioxonil Boscalid + Pyraclostrobin y Azoxistrobina + Difenoconazole (Obregón et al., 2020), pero su uso inadecuado puede convertirse en una problemática mayor por la resistencia que pueden provocar en el agente infeccioso.

III. METODOLOGÍA

3.1 Localización

El proyecto se realizó en las instalaciones del Instituto Tecnológico Superior de Abasolo (ITESA), con coordenadas geográficas 20°26”32.35”” N y 101°32”45.13”” O, con una altitud sobre el nivel del mar de 1760 m, con ubicación en Abasolo, Guanajuato (Figura 3.1).

El Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI, 2021) señala que en el municipio de Abasolo se presentan dos tipos de climas: el semicálido subhúmedo que predomina en la mayor parte del territorio, y el sub-húmedo con lluvias en verano, en una pequeña parte de la zona Norte. Por otra parte, Abasolo cuenta con suelos clasificados edafológicamente como: Vertisol pélico, Feozem háplico y Feozem calcárico (Secretaría de Seguridad Publica [SSP], 2022).

Durante el desarrollo del proyecto, la temperatura media dentro del invernadero fue de 20.45°C, con una máxima de 22.94°C y una mínima de 15.41°C; además, se tuvo una media de humedad relativa del 64.85%, así como una humedad máxima del 79.54%, y una humedad mínima del 57.62%.

Con el fin de resguardar al proyecto de cambios climáticos, se requirió de un invernadero que cuenta con una cubierta plástica de color blanco translucido al 75% de luz.

Figura 3.1 - Área de trabajo.

3.2 Especie a evaluar

La especie que se estableció fue fresa (*Fragaria* x *ananassa* Duch), por medio de cepellones de la variedad San Andreas (Figura 3.2).

Figura 3.2 - Cepellones de fresa.

3.3 Establecimiento del área de trabajo

Se realizó la construcción del invernadero con las dimensiones 3 x 6 m, para ello se utilizó el manual del fabricante y se siguió las indicaciones recomendadas para su correcta instalación (Figura 3.3).

Figura 3.3 - Armado del invernadero.

Una vez armada la estructura, se excavó una zanja para enterrar la malla y dar soporte al invernadero, además se colocó tezontle para evitar el contacto directo con el suelo (Figura 3.4).

Figura 3.4 - Colocación superficial del tezontle.

Posteriormente se dividió el invernadero a la mitad, para lo cual se utilizó plástico y estacas para dar soporte, debido a que solo se trabajó en la mitad de la estructura.

3.4 Desinfección del suelo y materiales de trabajo

Para la sanitización de la estructura se utilizó jabón en polvo biodegradable con el propósito de quitar los residuos presentes en cada una de las partes del invernadero, posteriormente se enjuagó con agua limpia (Figura 3.5).

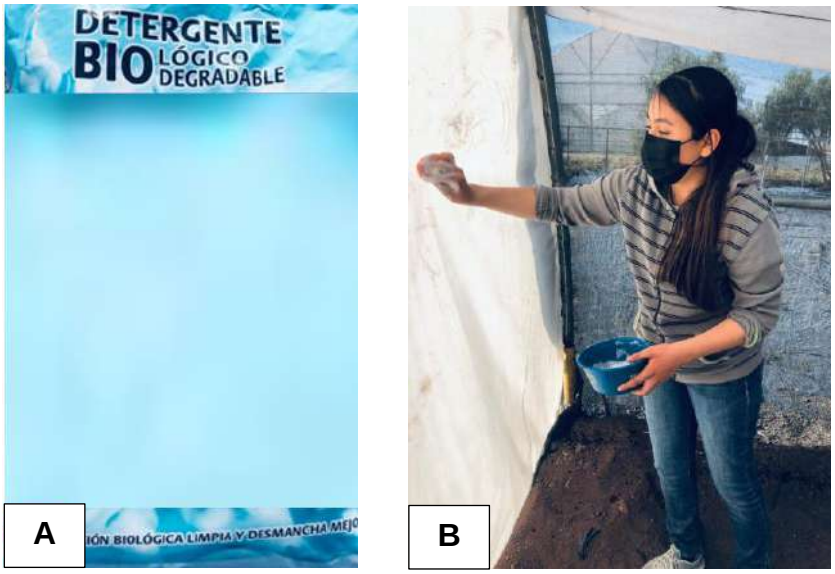
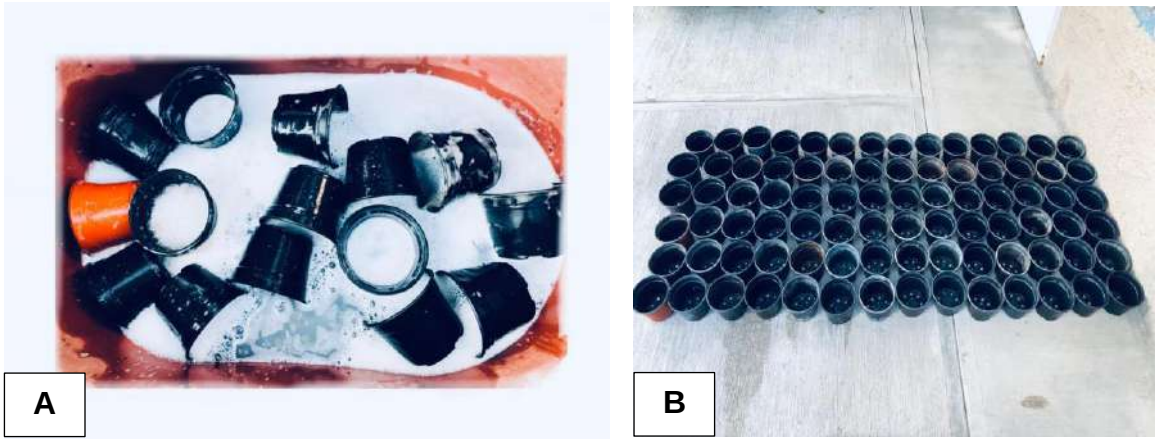


Figura 3.5 - Limpieza de la estructura: A) Jabón biodegradable que se utilizó y B) Eliminación de residuos.

Enseguida se aplicó un desinfectante agrícola de grado alimenticio que elimina bacterias, virus, hongos, esporas y biofilm. Se utilizó una mochila aspersora manual de la marca Pretul® FM-15P con capacidad de 15 L para aplicarlo en cada una de las partes del invernadero, con dosis de 500 ml por 15 L de agua (Figura 3.6).

Figura 3.6 - Esterilización de la estructura: A) Desinfectante agrícola utilizado, B) Máquina aspersora con 15 L de agua, C) Preparación del producto y D) Aplicación del producto.

Se aplicó la misma metodología para la desinfección de las macetas (Figura 3.7).



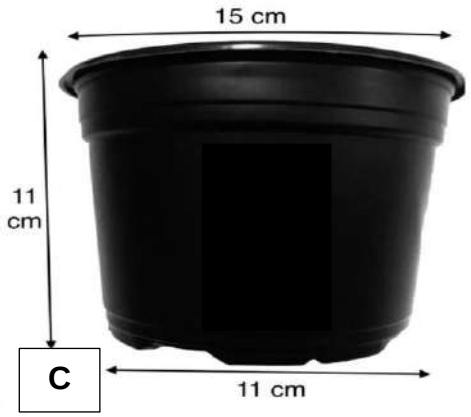


Figura 3.7 - Desinfección de las macetas: A) Eliminación de contaminantes, B) Macetas esterilizadas y C) Maceta de 1.3 L que se utilizarán en el experimento.

Por otra parte, para la esterilización del suelo (se utilizó suelo de la institución) se realizó mediante biosolarización, aplicando un fungicida-bactericida a base de extractos vegetales (extracto de gobernadora, pino y ácido cítrico), que actúa de manera translaminar y de contacto, el cual se utilizó directamente en el suelo, ayudando así a contrarrestar patógenos presentes. La dosis de aplicación se siguió de acuerdo con las indicaciones de la ficha técnica del producto (Figura 3.8).

LISTADO DE INGREDIENTES

Ingredientes Activos:

Extracto vegetal de Gobernadora *(Larrea tridentata)*
Equivalente a 368.60 g de i.a. /L ..... 36.0 %
Extracto vegetal de Pino *(Pinus pinaster)*
Equivalente a 102.39 g de i.a. /L ..... 10.0 %
Extracto vegetal de ácido cítrico
(Citrus limonum, Citrus aurantium)
Equivalente a 6.14 g de i.a. /L ..... 0.6 %

Ingredientes Inertes:

Emulsificante, tensoactivo, diluyente ..... 53.4 %
TOTAL: ..... 100 %

A

ÚSESE EXCLUSIVAMENTE
EN LOS CULTIVOS Y PLAGAS AQUÍ RECOMENDADOS

CULTIVO	PLAGA	DOSIS L/Ha	OBSERVACIONES
• Pepino • Sandía • Melón • Calabacita • Chayote • Calabaza (SL)	• Mildiu (*Pseudoperonospora cubensis*)	1.5 - 2.0	Realizar cuatro aplicaciones al follaje a intervalos de 7 días al momento en que aparezcan los primeros síntomas. Volumen de aplicación de 1.5 a 2.0 L en 300 L de agua /ha.
• Jitomate • Papa • Chile • Tomate cascara • Berenjena • Pimiento morrón • Tabaco (SL)	• Pudrición (*Botrytis cinerea*)	1.5 - 2.0	Realizar tres aplicaciones al follaje a intervalos de 7 días. Volumen de aplicación 1.5 a 2.0 L en 450 a 550 L de agua /ha.
• Arándano • Frambuesa • Fresa • Grosella • Mora • Zarzamora • Vid • Kiwi (SL)	• Pudrición (*Botrytis cinerea*)	1.5 - 2.0	Realizar cuatro aplicaciones al follaje a intervalos de 7 días al momento en que aparezcan los primeros síntomas. Volumen de aplicación de 1.5 a 2.0 L. en 350-450 L de agua /ha
• Brócoli • Col • Coliflor • Mostaza • Colza • Colinabo • Col de bruselas (SL)	• Mildiú (*Pseudoperonospora parasitica*)	1.0 - 2.0	Realizar cuatro aplicaciones al follaje a intervalos de 7 días de 1.0-2.0 L/ha. Volumen de aplicación 350 - 450 L de agua /ha.
• Acelga • Apio • Espinaca • Lechuga (SL)	• Mildiú (*Bremia lactucae*)	1.0 - 2.0	Realizar cuatro aplicaciones al follaje a intervalos de 7 días al presentarse los primeros síntomas de la enfermedad, de 1.0-2.0 L/ha. Volumen de aplicación 450 L de agua /ha.

B

Figura 3.8 - Fungicida - bactericida: A) Ingredientes activos e inertes, B) Ficha técnica y C) Producto utilizado.

En un plástico negro previamente lavado y desinfectado se colocaron 300 L de suelo formando una capa de 15 cm de altura (Figura 3.9).

Figura 3.9 - Suelo utilizado.

Se realizó la prueba de capacidad de campo para determinar la cantidad de agua que se utilizó al aplicar el producto al suelo, para ello se colocó 1 L de suelo en un recipiente, agregándole agua hasta llegar a capacidad de campo, utilizando 0.3 L de agua, comprobando con la prueba del puño. Se utilizaron 90 L de agua para 300 L de suelo (Figura 3.10).

Figura 3.10 - Prueba del puño.

- Cálculo del agua utilizada:

Litros de suelo	Capacidad de campo
1 L	0.3 L
300 L	**X = 90 L**

- Cálculo del producto a base de gobernadora, pino y ácido cítrico:

Dosis del producto	Cantidad de agua a aplicar
1500 ml	200 L
X= 675 ml	90 L

Del mismo modo se manipuló la metodología propuesta por Barrantes (1998), la cual expone lo siguiente: tapar el suelo con un plástico negro (sobre el suelo se aplica el producto) y sellar las orillas del plástico para evitar la entrada o salida del aire (Figura 3.11). La función del plástico negro permite que los rayos solares se absorban y que la temperatura aumente dentro del plástico. Se dejó en el sol durante 5 días, cada día se estuvo moviendo para evitar la compactación del suelo.

Consecuentemente esto evita el establecimiento de fitopatógenos, insectos y malas hierbas.

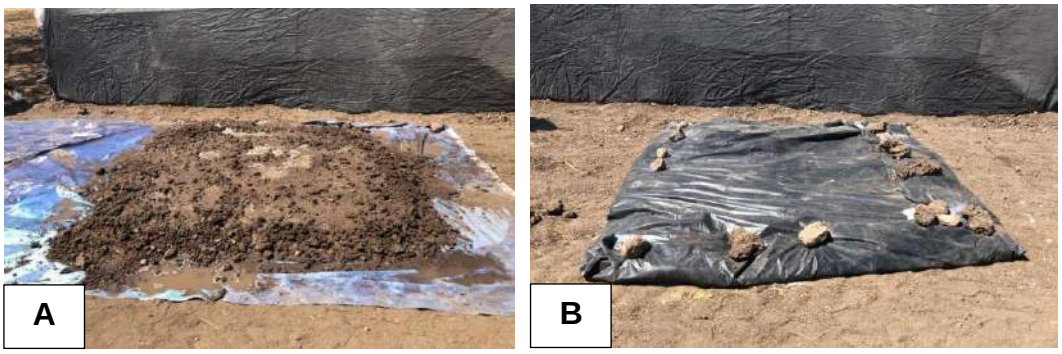


Figura 3.11 - Desinfección del suelo: A) Aplicación del producto y B) Suelo cubierto en plástico negro listo para el proceso de biosolarización.

3.5 Preparación del material vegetal

Se utilizaron 72 cepellones de fresa de la variedad San Andreas, procedentes de un vivero de la región; se colocaron en macetas de 1.3 L con suelo estéril, colocando cada planta en una maceta dentro del invernadero. Así mismo, la cubierta plástica aisló a las plantas del proyecto de los factores climáticos, plagas y enfermedades.

3.5.1 Trasplante

Las plantas de fresa se trasplantaron en las macetas, utilizando una herramienta manual, con el suelo estéril previamente humedecido y se aplicó un producto al momento de realizar el trasplante, sumergiendo las raíces, con ingrediente activo Propomocarb + Fosetil, como desinfectante siguiendo las instrucciones de la ficha técnica propuesta, para lo cual, se añadió un mililitro de producto a razón de un litro de agua (1 ml producto:1000 ml agua) (Figura 3.12).

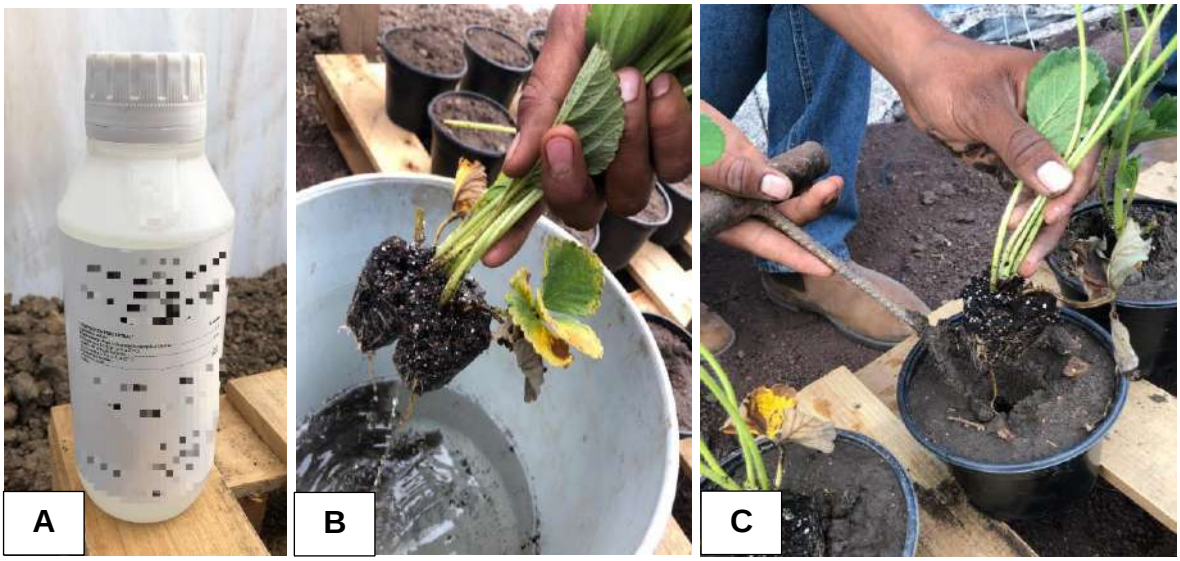
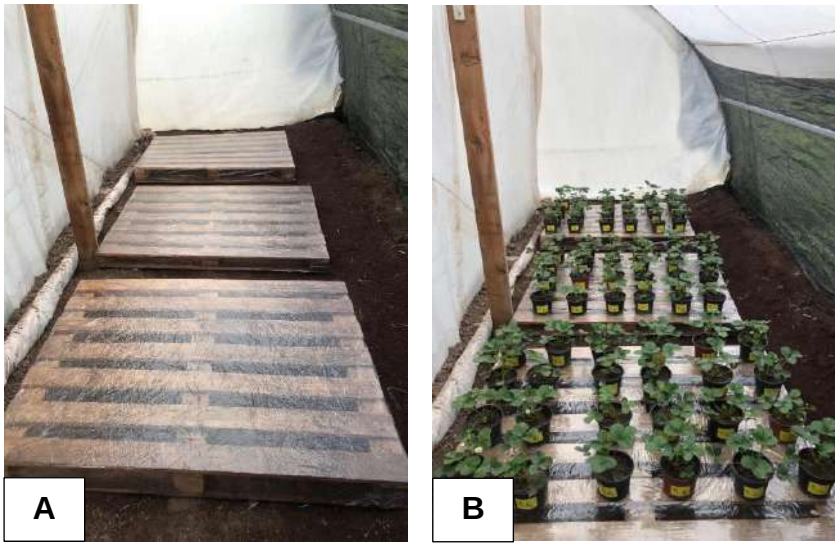


Figura 3.12 - Trasplante: A) Producto fúngico con ingrediente activo Propomocarb + Fosetil, B) Inmersión pre-trasplante y C) Trasplante de cepellones de fresa.

3.5.2 Distribución del material vegetal en el invernadero

Se coloco cada una de las plantas de fresa en macetas sobre tarimas para evitar el contacto directo con el suelo. Además, cada tarima se forró con plástico para evitar que el agua de escorrentía quedara en el suelo y por ende el patógeno se disemine en el suelo de la institución (Figura 3.13).



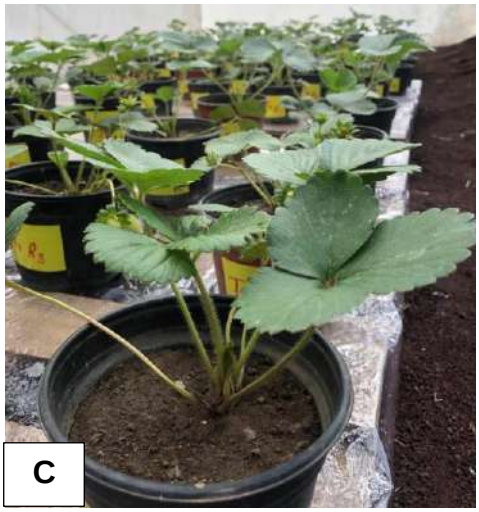


Figura 3.13 - A) Cubierta plástica para evitar el establecimiento del patógeno, B) Diseño experimental en campo y C) Identificación de cada planta por tratamiento y repetición.

3.6 Manejo del cultivo

3.6.1 Riego

Las plantas se regaron cada dos días desde su establecimiento en las macetas, el riego se efectuó de forma manual, en las primeras horas del día, cuando el sol estaba bajo en intensidad, colocando 150 ml de agua por planta.

3.6.2 Desarrollo del cultivo

Se monitoreó el desarrollo de los cepellones de fresa establecidos en las macetas, para lo cual, se tomaron fotografías del proceso durante el paso del tiempo (Figura 3.14).

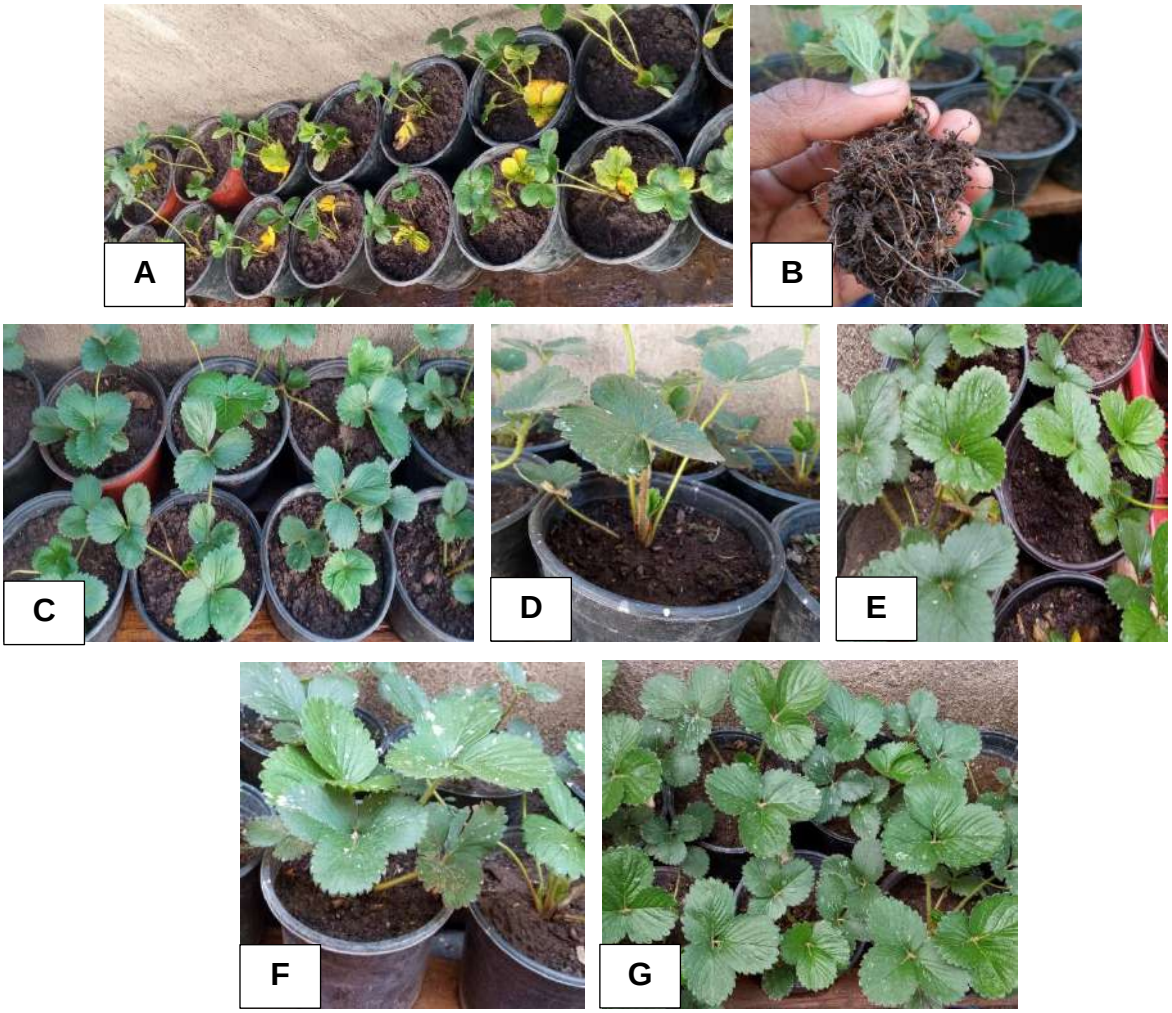


Figura 3.14 - Desarrollo de los cepellones de fresa en las macetas: A) 3 días después del trasplante (ddt), B) 4 ddt, C) 10 ddt, D) 13 ddt, E) 15 ddt, F) 21 ddt y G) 30 ddt.

3.6.3 Control de plagas

Se llevaron a cabo diversas aplicaciones con productos preventivos para *Tetranyhus urticae* (araña roja), *Bemisia tabaci* (mosca blanca), *Frankliniella occidentalis* (trips) y *Aphis gossypii* (pulgón); con el propósito de evitar estás plagas en el cultivo de fresa, y del mismo modo evadir los severos problemas que puede llegar a provocar, para lo cual se utilizó:

- Insecticida botánico a base de aceite de semilla de soya: se aplicó vía foliar, con intervalos de 8 días, desde el establecimiento del cultivo.
- Sales potásicas de ácidos grasos + organosiliconas: se aplicó vía foliar, con intervalo de 8 días, desde el momento en que aparecieron las primeras infestaciones.
- Repelente a base de *Oleroresina capsicum*: se aplicó vía foliar, con intervalo de 8 días, desde el momento en que aparecieron las primeras infestaciones.

Los productos se aplicaron con una aspersora manual de la marca Pretul® FM-15P con capacidad de 15 L, de acuerdo con la dosis correspondientes y propuestas en las fichas técnicas de cada producto, se realizó rotando cada producto para evitar crear resistencia en las plagas (Figura 3.15).

- Cálculo del insecticida botánico a base de aceite de semilla de soya:

Dosis del producto	**Cantidad de agua a utilizar**
1000 ml	200000 ml
X= 50 ml	10000 ml

- Cálculo del producto a base de sales potásicas de ácidos grasos + organosiliconas:

Dosis del producto	**Cantidad de agua a utilizar**
1500 ml	200000 ml
X= 75 ml	10000 ml

- Cálculo del repelente a base de *Oleroresina capsicum:*

Dosis del producto	Cantidad de agua a utilizar
1000 ml	200000 ml
X= 50 ml	10000 ml

Figura 3.15 - Productos aplicados: A) Insecticida botánico a base de aceite de semilla de soya, B) Sales potásicas de ácidos grasos + organosiliconas y C) Repelente a base de *Oleroresina capsicum.*

3.6.4 Fertilización

Se emplearon algas marinas y enraizador en el agua de riego durante los primeros 15 días (desde el momento del trasplante), con intervalos de 5 días, siguiendo la dosis de la ficha técnica del fabricante: añadiendo 10 g de producto a un litro de agua (10 g producto:1000 ml agua) (Figura 3.16).

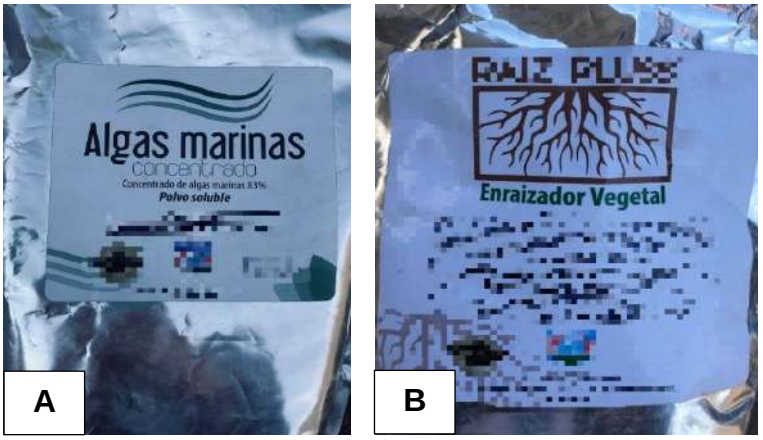


Figura 3.16 - A) Algas marinas y B) Enraizador.

Del mismo modo, se usó un regulador de crecimiento vegetal, que contiene auxinas, que favorecen el desarrollo de raíces y follaje; se disolvió y aplicó en el agua de riego desde los 7 ddt hasta los 21 ddt, con intervalos de 7 días, siguiendo la ficha técnica propuesta por el fabricante: añadiendo 6.25 g de producto a un litro de agua (6.25 g producto:1000 ml agua) (Figura 3.17).

Figura 3.17 - Regulador de crecimiento vegetal.

Se utilizó un fertilizante orgánico con el objetivo de estimular el desarrollo vegetativo del cultivo, se aplicó mediante el agua del riego desde los 10 ddt hasta los 30 ddt, con intervalo de 10 días, para lo cual se siguió la ficha técnica del fabricante: añadiendo 3.5 ml de producto a razón de un litro de agua (3.5 ml producto:1000 ml agua) (Figura 3.18).

Figura 3.18 - Fertilizante orgánico.

3.7 Selección de sitios de muestreo

El muestreo se realizó en campos agrícolas de Irapuato, Guanajuato, se obtuvo plantas con signos característicos de *Neopestalotiopsis* spp., se tomaron tres plantas por parcela, la muestra se efectuó en un campo con alta tecnología (macrotúnel, acolchado y cintilla) y otro sin tecnología (Figura 3. 19).

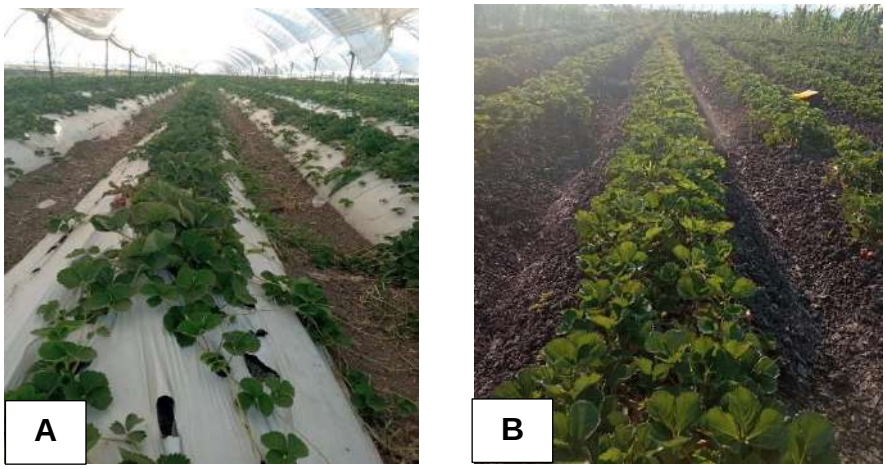


Figura 3.19 - Sitios de muestreo: A) Macrotúnel y B) Condiciones de campo.

Se tomaron plantas enteras, con follaje y raíces, para ello se obtuvieron plantas con suelo adherido para evitar daños y lograr que la planta sobreviva, inmediatamente se colocaron en una bolsa de plástico debidamente etiquetada, mediante el procedimiento presentado por Fertilab (2020), las muestras de plantas para el análisis de agentes fitopatógenos deben contar con la siguiente información: ubicación y nombre de la parcela, fecha de muestreo, datos del dueño de la parcela, nombre del cultivo y observaciones generales de los signos de la enfermedad en campo (Figura 3.20).

Figura 3.20 - Identificación de la muestra en campo.

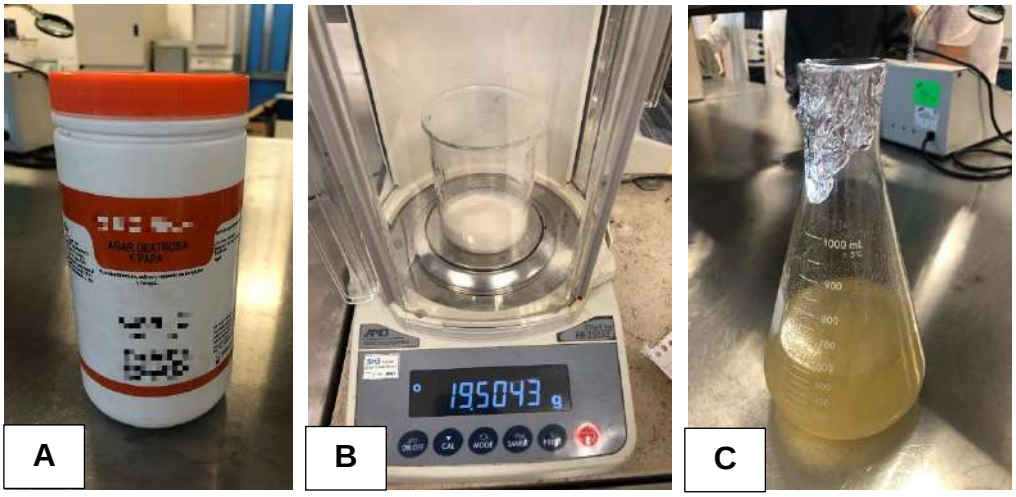
Una vez realizado el etiquetado y obtenidas las muestras, se llevó a cabo el aislamiento en el laboratorio del Instituto Tecnológico Superior de Abasolo.

3.8 Aislamiento e identificación del patógeno

El aislamiento se efectuó de acuerdo con los pasos descritos por Agrios (2005). Para la toma de muestras se removió el suelo de las raíces de las plantas enfermas a partir de plantas con signos de *Neopestalotiopsis* spp. y se preservaron en una bolsa etiquetada con su identificación. Posteriormente se lavó la raíz y el cuello de la planta enferma con agua de la llave para remover todas las impurezas (Figura 3.21).

Figura 3.21 - Eliminación de impurezas.

Se prepararon 19.5 g de medio de cultivo PDA (Bioxon®) de acuerdo con las indicaciones descritas por el fabricante. Se utilizó 500 ml de agua destilada realizando la homogenización de la mezcla en el matraz, posteriormente se tapó la boca del matraz con papel aluminio y enseguida se colocó en el autoclave de la marca Felisa® FE-399 por 40 minutos (Figura 3.22).



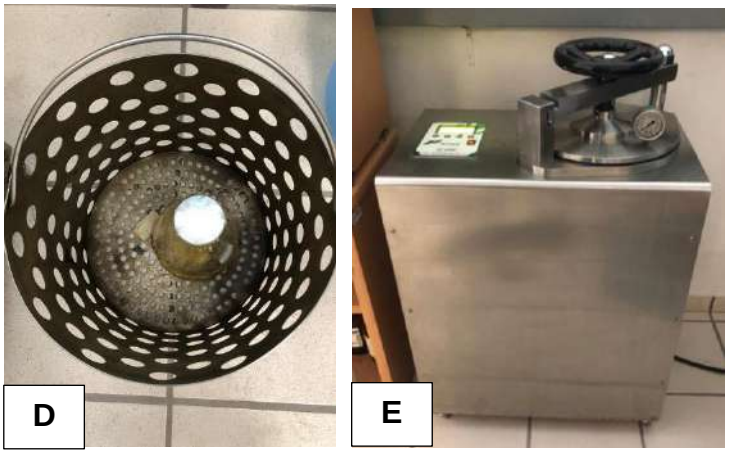


Figura 3.22 - Preraración del medio de cultivo: A) PDA, B) 19.5 g de PDA, C) Homogenización del PDA con agua destilada, D) Colocación del matraz con la mezcla en el autoclave y E) Autoclave programada en un ciclo de 40 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo en el autoclave, se dejó enfriar por 30 minutos. Se esterilizó el área de trabajo y consecutivamente se encendió el mechero, para inmediatamente colocar el material de trabajo. Previo a esto se lavaron las manos con agua y jabón además de colocar alcohol en la superficie.

Enseguida se vació el medio de cultivo en las cajas Petri, dejando reposar por 20 minutos, para después rotular cada una de las cajas (Figura 3.23).

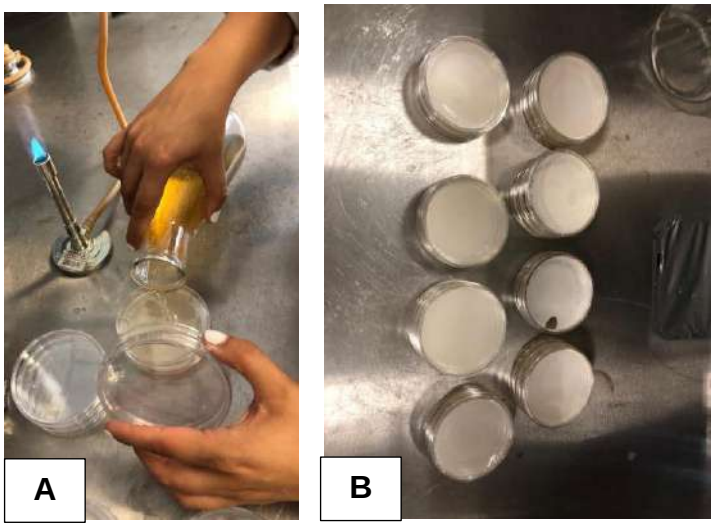
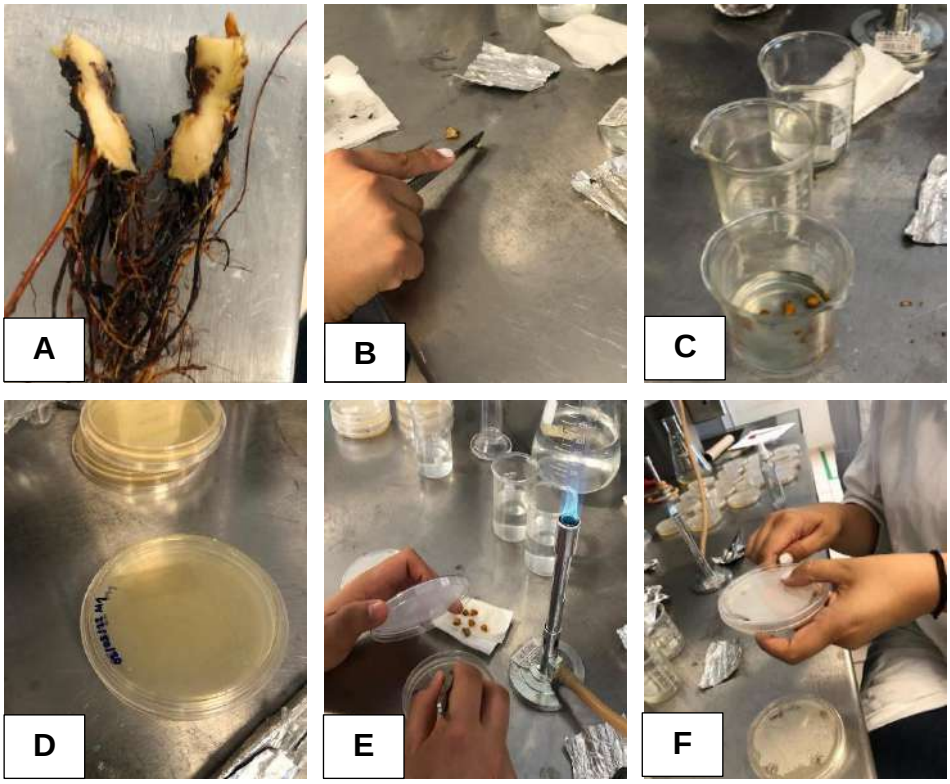


Figura 3.23 - A) Distribución del medio de cultivo en cajas Petri y B) Cajas Petri utilizadas.

En el caso de la corona y hoja, se identificaron las zonas de transición y se cortó tejido de 16 mm^2 aproximadamente.

Posteriormente se desinfectaron las muestras en una solución con cloro (Cl) al 5% por 30 segundos y luego se pasaron por un doble lavado en agua estéril. Enseguida los trozos de tejido se secaron en papel absorbente estéril.

A continuación, se colocaron los tejidos distribuidos de manera ecuánime en cada caja Petri con medio de cultivo PDA. Se sellaron las cajas con Parafilm®, para incubarse a 28° C durante 15 días (Figura 3.24).



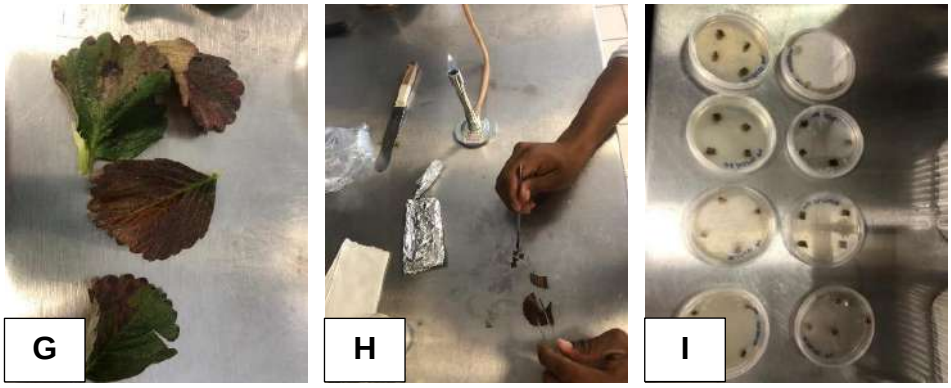


Figura 3.24 - Aislamiento: A) Muestra de corona, B) Toma de muestras a 16 mm^2, C) Esterilización, D) Rotulado de las cajas, E) Siembra, F) Sellado de las cajas, G) Muestra de hoja, H) Toma de muestras a 16 mm^2 y I) Aislados realizados en M1, M2, M3 y M4.

Se obtuvieron ocho muestras, cuatro de corona y cuatro de hojas (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 - Muestras en corona y hoja.

Macrotúnel (M1)	**Macrotúnel (M2)**	**En condición de campo (M3)**	**En condición de campo (M4)**
Dos aislados de corona	Dos aislados de corona	Dos aislados de hoja	Dos aislados de hoja

Después de 15 días se obtuvieron crecimientos fúngicos (Figura 3.25).

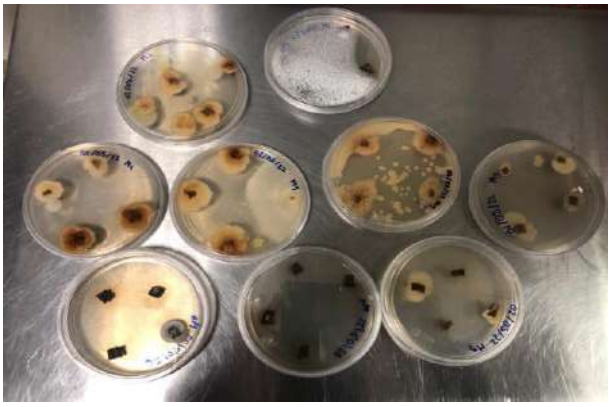


Figura 3.25 - Aislados de las muestras obtenidas en campo.

Una vez obtenidos los aislados, se seleccionaron los crecimientos fúngicos con las características morfológicas macroscópicas que pudieran corresponder al género *Neopestalotiopsis* (Machín, 2017). Con el fin de realizar su purificación y mantenimiento en PDA, se obtuvo un crecimiento fúngico con posibles características correspondientes a *Neopestalotiopsis* spp. en M2 (aislados de corona).

Se realizó la purificación del aislado obtenido de corona (M2) (Figura 3.26).

Figura 3.26 - Muestra con características morfológicas similares al género *Neopestalotiopsis* spp.

Consecuentemente, para la purificación del hongo, se preparó medio de cultivo PDA (MCD Lab®) de acuerdo con la metodología antes descrita (Figura 3.27).

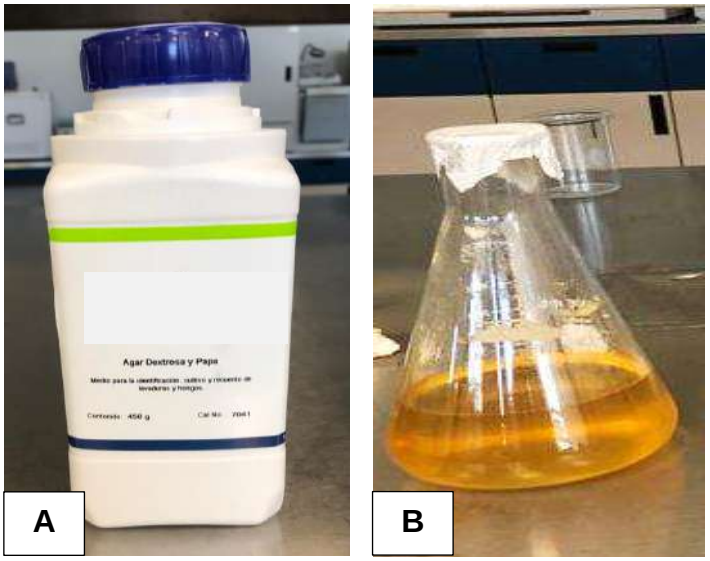


Figura 3.27 - A) Medio de cultivo y B) PDA preparado.

Para realizar la resiembra se utilizó un asa bacteriológica la cual se colocó en alcohol y posteriormente en la flama de un mechero, esto con el propósito de evitar la contaminación de la muestra. Enseguida se tomó parte del inoculo con el asa y se sitúo sobre el centro de la placa, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación, cada una de las cajas Petri se sellaron con Parafilm® (Figura 3.28). Una vez sembrado se incubó por periodos de 10 a 15 días aproximadamente con una temperatura de 25 °C.

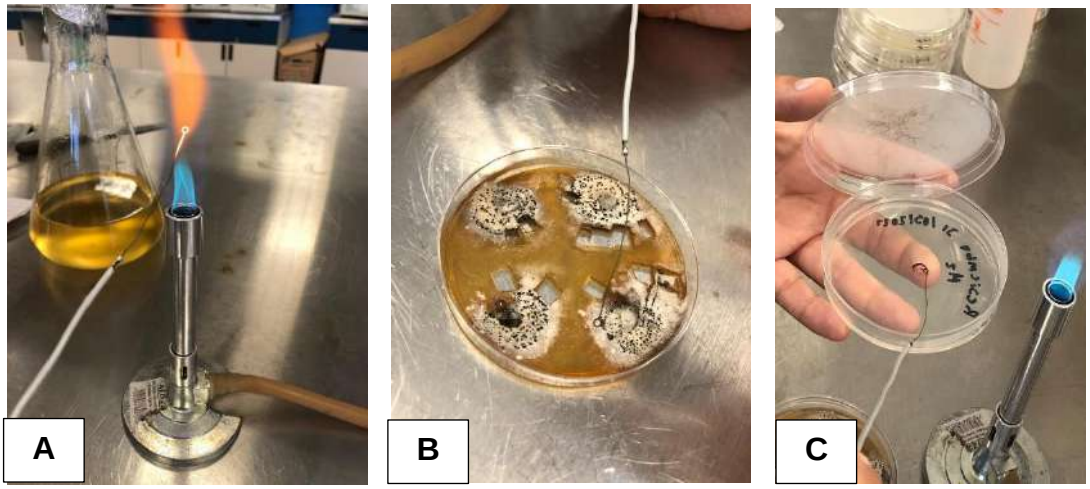


Figura 3.28 - Siembra en cajas Petri: A) Esterilización del asa, B) Extración del inóculo y C) siembra en el nuevo medio.

Se realizó un total de doce resiembras provenientes de la muestra M2 (Figura 3.29).

Figura 3.29 - Incubación de las muestras provenientes de M2.

Después de diez días se obtuvieron crecimientos fúngicos en cada una de las cajas Petri (Figura 3.30).

Figura 3.30 - Crecimiento fúngico con características macroscópicas aparentemente de *Neopestalotiopsis* spp.

3.8.1 Identificación morfológica

La identificación morfológica se llevó a cabo por medio de un microscopio de la marca Primo Star iLED de Zeiss, utilizando la metodología definida por González et al. (2020), por lo cual se necesitó de solución de azul de algodón, agua destilada, pipeta, asa bacteriológica, portaobjetos y cubreobjetos. Se desinfectó el área de trabajo, así como el material que se utilizó para evitar contaminaciones cruzadas tanto en el medio de cultivo como en las observaciones; después se colocó una gota de agua destilada sobre el portaobjetos, enseguida con el asa se tomó inóculo del medio de cultivo con crecimiento fúngico esporulado y se posicionó sobre la gota para después asegurarla con el cubreobjetos, con el propósito de observarse en los distintos objetivos del microscopio (características como el tamaño y forma del fitopatógeno) (Figura 3.31).

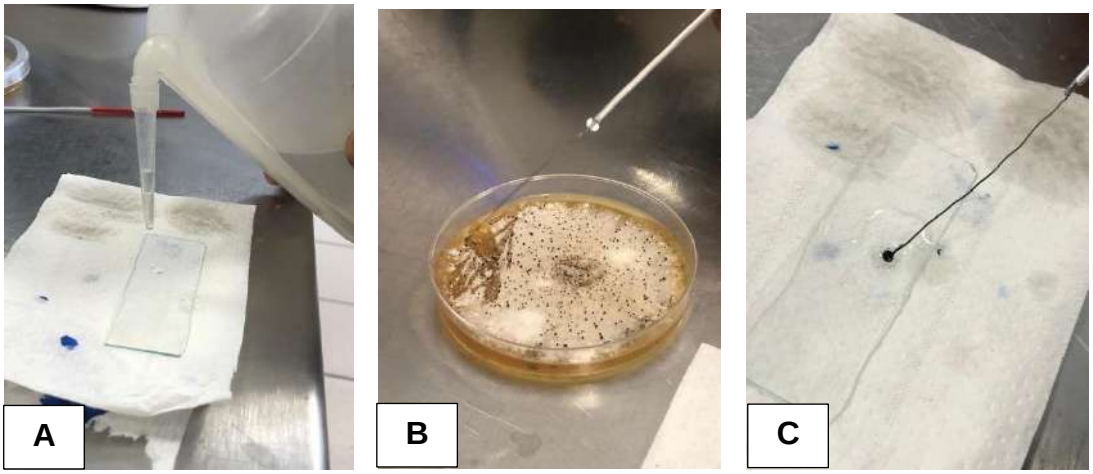
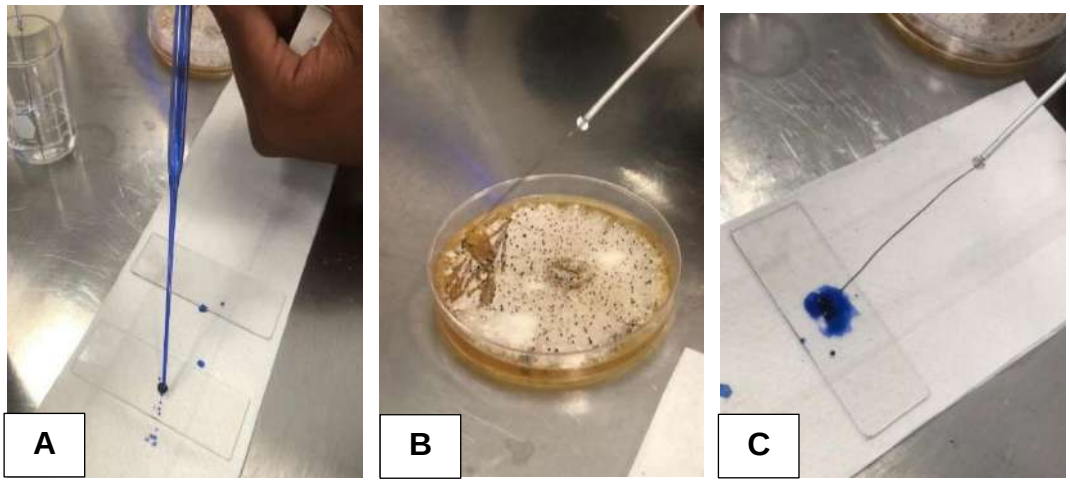


Figura 3.31 - Preparación de la muestra para la identificación del fitopatógeno con agua destilada: A) Gota de agua destilada en el portaobjetos, B) Medio de cultivo esporulado y C) Colocación del inóculo en el portaobjetos.

Posteriormente se tomó solución de azul de algodón con una pipeta y se colocó sobre el portaobjetos, consecutivamente con el asa se tomó inóculo del medio de cultivo y se agregó sobre la gota para después asegurarla con el cubreobjetos y observarla al microscopio para su análisis (Figura 3.32).



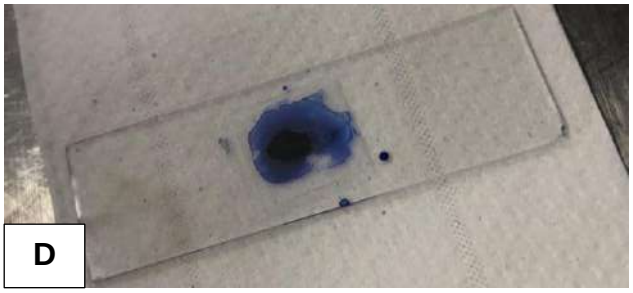


Figura 3.32 - Preparación de la muestra para la identificación del fitopatógeno con azul de metileno: A) Gota de azul de metileno en el portaobjetos, B) Medio de cultivo esporulado, C) Colocación del inóculo en el portaobjetos y D) Fijación de la muestra con el cubreobjetos.

3.9 Inoculación del patógeno en la planta

3.9.1 Incisión en el tallo

Se inocularon 60 plantas de fresa siguiendo la metodología descrita por Rosso et al. (2021), con un diámetro del cuello de la raíz superior a 6 mm y 8 hojas en promedio (8 a 9 semanas después del trasplante) establecidas en el invernadero, infestando las plantas de fresa con *Neopestalotiopsis* spp.; realizando cortes en la planta y en el medio de cultivo. Para lo cual se ubicó un área cerrada para realizar la infestación, sanitizando el espacio de trabajo, de igual manera se desinfectó la sección basal del tallo de fresa con una solución de alcohol etílico al 70% utilizando un algodón, para la desinfección del bisturí se utilizó una solución de alcohol etílico al 70% durante 15 minutos (se realizó este procedimiento entre cada corte de PDA infectado y entre cada corte por planta).

Posteriormente, se realizaron los cortes en el PDA infectado de 15 a 20 mm^2 con ayuda del bisturí previamente desinfectado y se realizaron los cortes en forma de bisel de aproximadamente 50% del diámetro en la base del tallo a 3 cm de altura del suelo. Enseguida sobre la herida se colocó el corte de PDA infectado con *Neopestalotiopsis* spp. de entre 15 a 20 mm^2 para posteriormente cubrir el corte y el PDA con cinta Floraltex® adherida a presión (Figura 3.33).

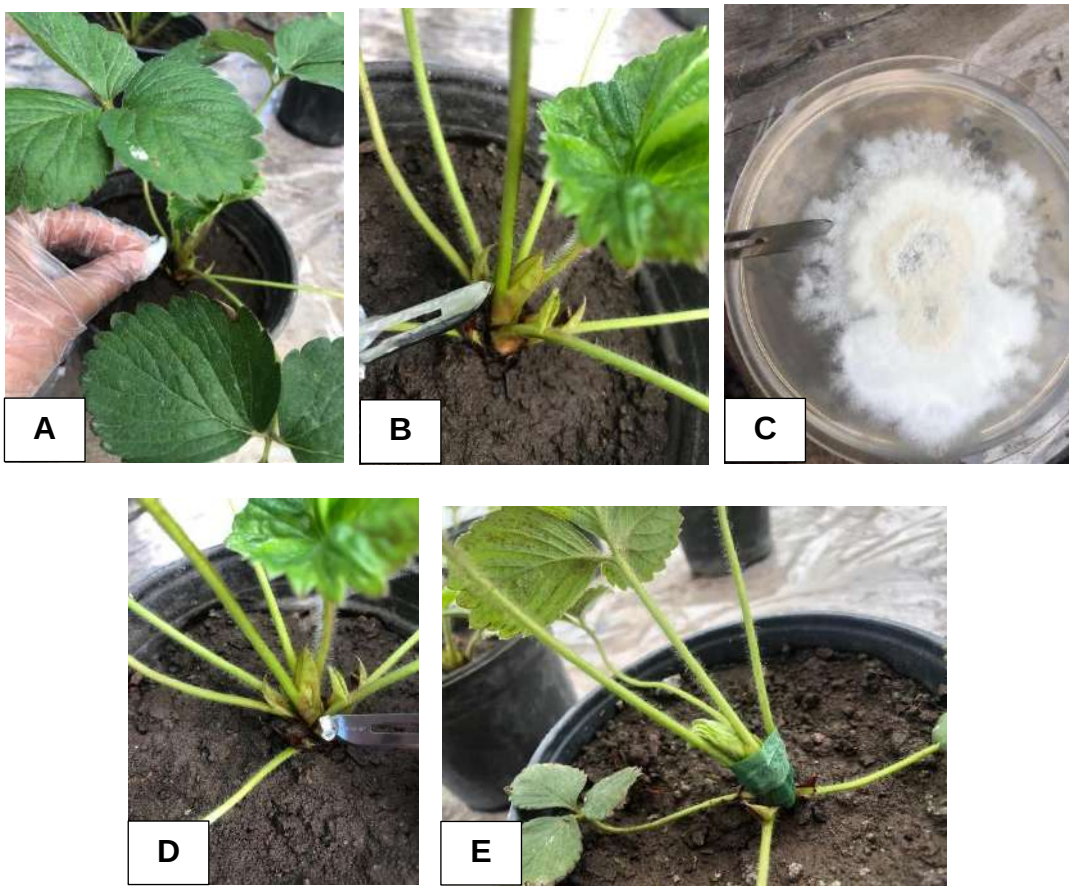


Figura 3.33 - Inoculación directa: A) Desinfeción del tallo de la planta, B) Realización de los cortes con el bisturí a la altura de 3 cm a partir del nivel del suelo, C) Con la ayuda de otro bisturí realizar los cortes en el PDA infectado, D) Colocación del corte de PDA infectado en la herida que se realizó en la planta y E) Cubrir la herida con cinta Floraltexl®.

3.10 Diseño experimental

Se empleó un diseño de bloques completamente aleatorio (DBCA) con tres bloques (Figura 3.34), tres tratamientos orgánicos con acción fúngica y un producto convencional a base de ingrediente activo (Cyprodinil + Fludioxonil), así como un testigo sano y un testigo enfermo (patógeno sin ningún tratamiento), se utilizaron plantas de fresa en cepellón de la variedad San Andreas, empleando cuatro plantas por tratamiento, teniendo 24 plantas por repetición, con tres repeticiones y un total de 72 plantas.

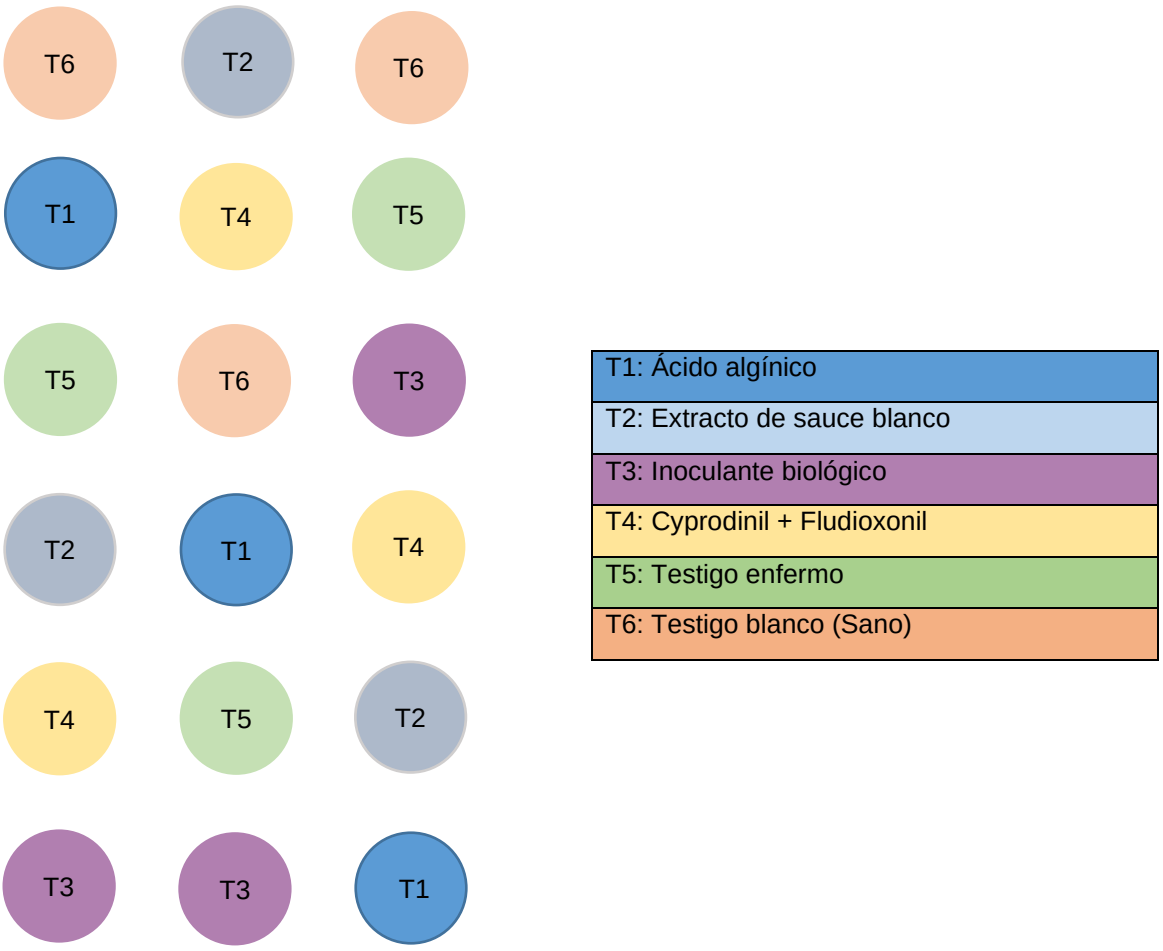


Figura 3.34 - Arreglo de los tratamientos en campo.

3.11 Tratamientos

Se emplearon: ácido algínico (T1), extracto de sauce blanco (T2), inoculante biológico (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* 1x10^9 UFC/ml) (T3), producto químico a base de Cyprodinil + Fludioxonil (T4), un testigo infectado (T5) y un testigo sano (T6) (Tabla 3.2). En la Tabla 3.2 se describieron los tratamientos y la cantidad de producto utilizado, respectivamente.

Tabla 3.2 - Tratamientos.

Número de tratamientos	Descripción	Dosis para 500 ml de agua
1	Ácido algínico	3.75 ml
2	Extracto de sauce blanco	2.5 g
3	Inoculante biológico	5 ml
4	Cyprodinil + Fludioxonil	2.5 g
5	Testigo enfermo	
6	Testigo sano	

3.11.1 Aplicación de los tratamientos

La aplicación de los tratamientos (Figura 3.35) se realizó de acuerdo con la ficha técnica de cada producto:

- Extracto orgánico a base de ácido algínico (T1): se aplicó en drench a intervalos de 7 días, desde el momento de aparecer los primeros signos.
- Extracto de sauce blanco (T2): se aplicó vía foliar, con intervalo de 7 días, desde el momento de aparecer los primeros signos.
- Inoculante biológico (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*) (T3): se aplicó en drench, con intervalo de 7 días, se utilizó cuatro semanas antes a la inoculación del patógeno en la planta.
- Tratamiento químico a base de Cyprodinil + Fludioxonil (T4): se aplicó vía foliar, con intervalo de 7 días, desde el momento de aparecer los primeros signos.
- Testigo blanco (testigo sano).
- Testigo infectado.

Figura 3.35 - Tratamientos utilizados: A) Tratamiento 1, B) Tratamiento 2, C) Tratamiento 3 y D) Tratamiento 4.

Los productos se colocaron en un atomizador (Figura 3.36), con la dosis correspondientes y propuestas en las fichas técnicas de cada producto, el proceso de aplicación se realizó de forma manual, se roció de manera uniforme sobre las plantas, y se situaron en el suelo a manera de drench (de acuerdo con cada tratamiento). La aplicación de los productos se realizó de acuerdo con el diseño experimental (Figura 3.37).

Figura 3.36 - Atomizadores para la aplicación de los tratamientos.

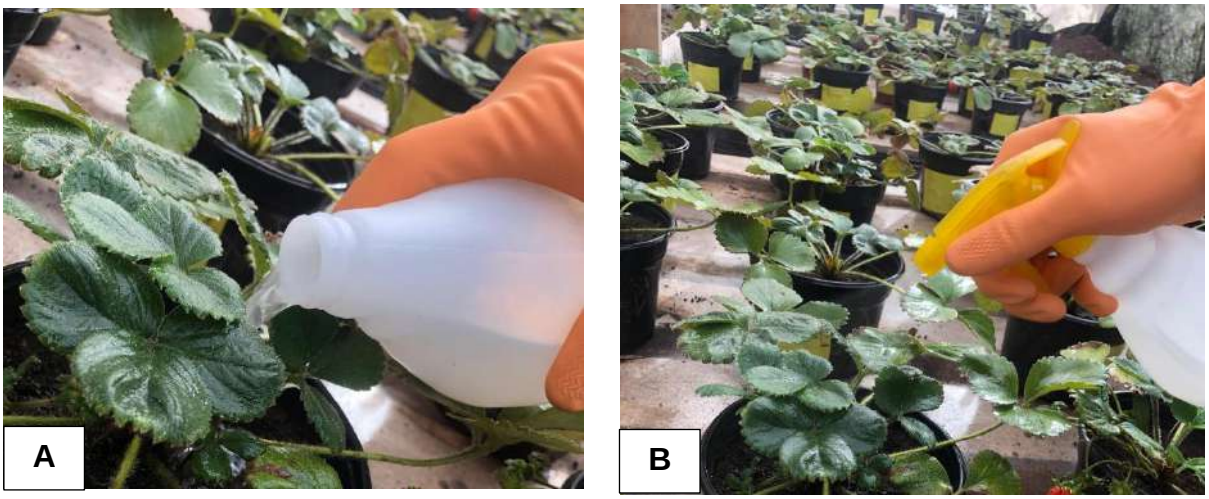


Figura 3.37 - A) Aplicación en drench y B) Aplicación vía foliar.

3.11.2 Cálculos para la dosis de cada producto

Se aplicó cada producto de acuerdo con las dosis de uso, descrita en la ficha técnica (Figura 3.38).